

**Der Aktivitätskoeffizient von KCl
in hochkonzentrierten Hämoglobinlösungen
und in Erythrozyten**

von
Godehard Menges
aus
Opladen

1973 # 429

Aus dem Institut für Physikalische und Medizinische Strahlenkunde
der Universität Erlangen-Nürnberg
Direktor: Prof. Dr. med., Dr. phil. nat. H. Pauly

Der Aktivitätskoeffizient von KCl in hochkonzentrierten Hämoglobinlösungen und in Erythrozyten



Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg

vorgelegt
von
Godehard Menges
aus
Opladen

Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen Fakultät der
Universität Erlangen-Nürnberg



Dekan:

Prof. Dr. L. Demling

Referent:

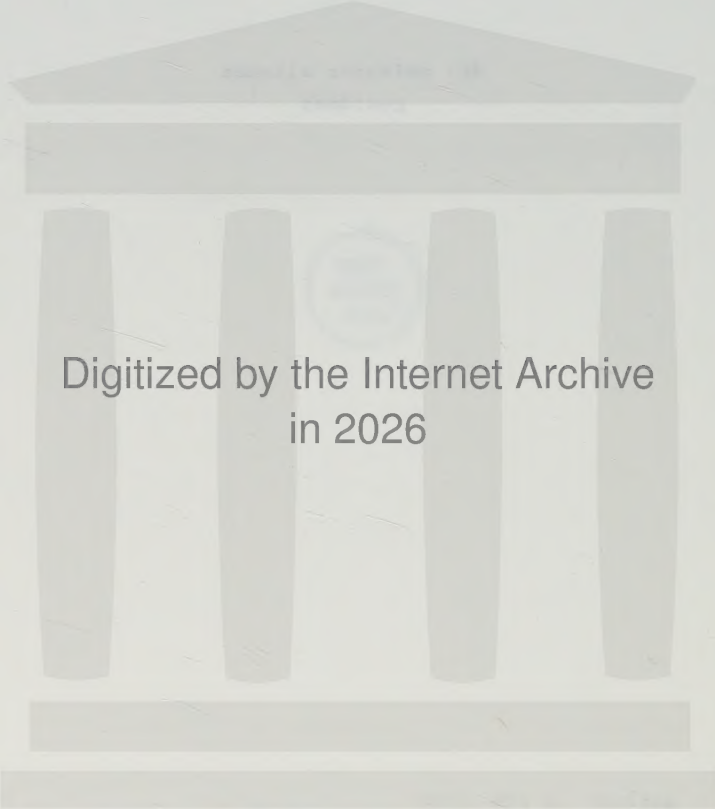
Prof. Dr. Dr. H. Pauly

Tag der mündlichen Prüfung:

22. Oktober 1973

dr. salvador allende

gewidmet



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548408_0023

INHALTSVERZEICHNIS

Seite:

1.	EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG	1
2.	METHODIK	5
2.1	Theorie der Messung	5
2.1.1	Die EMK von elektrochemischen Meßketten mit Membranen	5
2.1.2	Bestimmung der mittleren Aktivität	13
2.2	Herstellung der Hämoglobin-KCl-Lösungen	14
2.2.1	Hämoglobin-Stammlösung	14
2.2.2	Diafiltration der Hämoglobin-Stammlösung	16
2.3	Analyse der Hämoglobin-KCl-Lösungen	19
2.3.1	Bestimmung der Hämoglobinkonzentration	19
2.3.2	Bestimmung des pH-Wertes	20
2.3.3	Extinktionsmessung	20
2.3.4	Gelfiltration	22
2.3.5	Bestimmung der Chlorid-Konzentration	24
2.3.6	Bestimmung der Kalium-Konzentration	28
2.4	Messung der mittleren Aktivität	34
2.4.1	Meßanordnung	34
2.4.2	Meßzelle	36
2.4.3	Ionenaustauscher-Membranen	38
2.4.4	Elektroden	39
2.4.5	KCl-Brücken	39
2.4.6	Elektrische Meßgeräte	40
2.4.7	Titrationlösungen	41
2.4.8	Meßvorgang	42

Seite:

3.	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	46
3.1	Berechnung des mittleren Aktivitätskoeffizienten	46
3.2	Berücksichtigung der Protein-Wasser-Wechselwirkungen	51
3.3	Deutung der Ergebnisse als elektrostatische Aktivitätskoeffizienten	58
3.4	Deutung der Ergebnisse als spezifische Bindung von Ionen am Hämoglobin-Molekül	61
3.5	Vergleich der Ergebnisse mit Literaturwerten	69
4.	FEHLERRECHNUNG	71
5.	ZUSAMMENFASSUNG	74
6.	LITERATUR	76

1. Einleitung und Problemstellung

Der thermodynamische Zustand der kleinen Ionen im Zytoplasma ist für das Verständnis biologischer Phänomene in der lebenden Zelle und ihrer Umgebung von großer Bedeutung. Die Deutung der Potentialbildung an der Zellmembran oder die Abgrenzung aktiver Transportmechanismen gegen die passiven Flüsse beim Stoffaustausch durch die Zellmembran setzt die Kenntnis der chemischen Potentiale auch der kleinen Ionen im Zytoplasma und in der extrazellulären Flüssigkeit voraus.

Während die extrazelluläre Flüssigkeit in guter Näherung als einfache wäßrige Salzlösung betrachtet werden kann, haben wir es beim Zytoplasma mit einem komplizierten Mehrkomponenten-System zu tun.

Die chemische Zusammensetzung des Zytoplasmas besteht aus Wasser (70 - 85%), Proteinen (10 - 20%), Lipiden, Nukleinsäuren, Kohlehydraten, anorganischen, meist dissoziierten Salzen (1-2%) sowie aus verschiedenartigen organischen Metaboliten. Neben dem mengenmäßig überwiegenden Zellwasser fällt den Proteinen mit ihren zahlreichen elektrischen Ladungsgruppen und ihren Stoffwechselfunktionen eine weitreichende Rolle zu. Der Molekülnzahl entsprechend stellen jedoch nach dem Zellwasser die kleinen Ionen wie K^+ , Na^+ , Mg^{++} , Ca^{++} , Cl^- , HCO_3^- und $H_2PO_4^-$ den größten Anteil. Ihre Konzentration im Zytoplasma beträgt bei allen bekannten Zellarten 0,1 bis 0,3 Mol pro kg Zellwasser.

Man kann somit erwarten, daß das Zellwasser, die Proteine, die kleinen Ionen und die Wechselwirkungen dieser Komponenten untereinander vorwiegend das intrazelluläre Milieu bestimmen.

Für eine Modellvorstellung ist es praktisch, das Zytoplasma als wässrige Lösung von Salzen und Proteinen aufzufassen. Diese Vorstellung wird gestützt durch die Ergebnisse zahlreicher Untersuchungen, wie die Messung der intrazellulären Leitfähigkeit mit hochfrequentem Wechselstrom von PAULY [38-42], der Diffusionsgeschwindigkeit kleiner Ionen und Moleküle in der Zelle [7, 27] oder der kalorischen Eigenschaften des Zellwassers [5, 34, 23] zeigt.

Andere Untersuchungen lassen dagegen das Zytoplasma strukturiert erscheinen, in einem hochgeordneten Zustand also, in dem die einzelnen Komponenten durch starke Wechselwirkungskräfte gleichsam immobilisiert werden [24, 30, 32] wie in einem Festkörper.

TROSHIN [56] und LING [28-31] haben dementsprechend in ihrer Sorptionstheorie bzw. Assoziations-Induktions-Hypothese den Makromolekülen des Zytoplasmas ein hohes Wasserbindungsvermögen zugeschrieben, wobei die kleinen Ionen in einem starren Netzwerk "festhängen" und nicht mehr frei im Zellwasser gelöst sind.

Für die Salze des Zytoplasmas müßte diese Einschränkung ihrer Löslichkeit eine beachtliche Erniedrigung ihres chemischen Potentials bedeuten, was sich jedoch bisher für hochkonzentrierte Proteinlösungen nicht nachweisen ließ. So zeigen Messungen des mittleren Aktivitäts-

koeffizienten von KCl in konzentrierten Rinderserumalbumin-Lösungen und in Zytoplasma-Fractionen aus Kalbsleberzellen [43,45] , daß der größte Teil der Salzionen als "frei" betrachtet werden muß.

Zur Überprüfung dieser Befunde wurden in der vorliegenden Arbeit die Wechselwirkungen von KCl mit Hämoglobinmolekülen in hochkonzentrierten Hämoglobin-KCl-Lösungen untersucht. Wie auch in den zitierten Arbeiten wird die grundlegende Annahme gemacht, daß im Zytoplasma die gleichen Wechselwirkungen eine Rolle spielen wie in den konzentrierten Protein-Salz-Lösungen. Die Hb-KCl-Lösungen insbesondere werden als einfaches Modell für das Zytoplasma des Erythrozyten aufgefaßt.

Entsprechend der verhältnismäßig hohen Kaliumkonzentration im Erythrozyten betrug die KCl-Konzentration 0.1 Mol pro kg Wasser; ebenso lag die Hämoglobinkonzentration (bis zu 45 Gew.-%) im physiologischen Bereich.

Bei einer derart konzentrierten Proteinlösung, wie sie auch im Erythrozyten des Menschen und im Rindererythrozyten (33-35 Gew.-%) vorhanden ist, liegen die Hämoglobinmoleküle relativ nahe beieinander; bei 35 Gew.-% Proteingehalt und 0.1 Mol Salz pro kg Wasser entfallen etwa 26-30 Ionen auf ein Hb-Molekül. Diese gedrängten Raumverhältnisse lassen eine erhebliche Beeinflussung der kleinen Ionen erwarten.

Als Maß für die Wechselwirkungen der gelösten Salzionen untereinander und mit den übrigen Komponenten des Systems diente in der vorliegenden Arbeit der mittlere Aktivitätskoeffizient des Salzes. Zusammen mit den Ionenkonzentrationen bestimmt er das chemische Potential des Salzes in der Protein-Salz-Lösung.

Während die Einzelionenaktivitätskoeffizienten einer Messung aus prinzipiellen thermodynamischen Gründen nicht zugänglich sind [21], kann der mittlere Aktivitätskoeffizient des Salzes z.B. aus EMK-Messungen an elektrochemischen Meßketten und mit geeigneten Elektroden bestimmt werden. In der vorliegenden Arbeit wurden hierzu - einem Vorschlag von SCATCHARD [51] folgend - Ionenaustauscher-"Membran-Elektroden" [8,52] verwendet.

2. Methodik

2.1 Theorie der Messung

2.1.1 Die EMK elektrochemischer Meßzellen mit Membranen

Die elektrochemische Kraft EMK einer galvanischen Zelle ist definiert als Potentialdifferenz E , die im stromlosen Zustand zwischen den Elektroden abgegriffen werden kann. Mit Hilfe einer von außen angelegten Kompensationsspannung läßt sich die Potentialdifferenz stromlos messen.

Die EMK ist thermodynamisch bestimmt durch die Beziehung [22] :

$$-\Delta G = F \cdot E ,$$

(1)

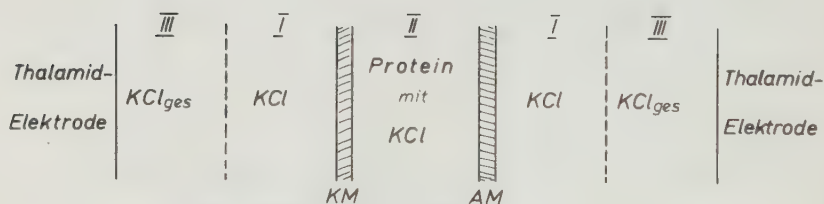
wobei ΔG	die Änderung der freien Enthalpie der elektrochemischen Zelle,
F	die Faraday-Konstante und
E	die EMK zwischen den beiden Elektroden, gemessen im stromlosen Zustand, ist.

Die bei der reversiblen Verschiebung von einem Mol Elektroden über die Potentialdifferenz E im Stromkreis geleistete elektrische Arbeit FE ist gleich der Abnahme der freien Enthalpie $-\Delta G$ der Zelle.

Die Änderung der freien Enthalpie ΔG der Meßkette läßt sich aufspalten in Änderungen der freien Enthalpie, die durch die Elektrodenreaktionen bedingt sind, ΔG_{E1} , und solche, die auf Ionenüberführung beruhen $\Delta G_{Üb}$:

$$\Delta G = \Delta G_{E1} + \Delta G_{Üb} \quad (2)$$

Folgende spezielle elektrische Meßzelle soll nun behandelt werden:



Die Phasen I sind reine KCl-Lösungen gleicher Konzentration. Phase II besteht aus einer Protein-KCl-Lösung. Die Phasen III, in die jeweils eine Cl^- -reversible Thalamidelektrode eintaucht, bestehen aus gesättigter KCl-Lösung (Salzbrücken). AM ist eine Anionenaustauscher- und KM eine Kationenaustauscher-membran.

Die Summe der Änderungen der freien Enthalpie an den Elektroden ΔG_{El} ist gleich Null, da diese in identische Lösungen eintauchen und gegeneinander geschaltet sind. Die Beiträge zu $\Delta G_{Üb}$ an den Phasenübergängen I/III und III/I (liquid junctions) heben sich gegenseitig auf, so daß nur noch diejenigen Anteile an der Änderung der freien Enthalpie zu beachten sind, die bei der Ionenüberführung durch die Membranen auftreten; es wird hierbei jedoch vorausgesetzt, daß die Membranen vollständig mit K^+ - bzw. Cl^- -Ionen beladen sind, eine Überführung von Protein durch die Membranen nicht stattfindet und die Änderung der freien Enthalpie durch die Überführung von Wasser, H^+ - und OH^- -Ionen vernachlässigt werden kann [43] (siehe auch Seite 8).

Für die Überführung in den Membranen gilt allgemein:

$$\Delta G_{Üb} = \left(\sum_i n_i \Delta \mu_i \right)_{KM} + \left(\sum_i n_i \Delta \mu_i \right)_{AM} ,$$

(3)

wobei n_i die Anzahl der überführten Mole der Ionensorte i und

$\Delta \mu_i$ die Änderung des chemischen Potentials der Ionensorte i bedeutet.

Da nach obiger Voraussetzung die Terme vernachlässigt werden können, die die Überführung von Wasser, H^+ - und OH^- -Ionen beschreiben, gilt:

$$\Delta G_{\text{Üb}} = n_{K^+}^{KM} (\mu_{K^+}^{II} - \mu_{K^+}^I) + n_{Cl^-}^{KM} (\mu_{Cl^-}^{II} - \mu_{Cl^-}^I) + n_{K^+}^{AM} (\mu_{K^+}^I - \mu_{K^+}^{II}) + n_{Cl^-}^{AM} (\mu_{Cl^-}^I - \mu_{Cl^-}^{II}),$$

(4)

wobei $n_{Cl^-}^{KM}, n_{Cl^-}^{AM}$ die Anzahl der überführten Mole Chloridionen durch die Kationen- bzw. Anionenaustauschermembran,

$n_{K^+}^{KM}, n_{K^+}^{AM}$ die Anzahl der überführten Mole Kaliumionen durch die Kationen- bzw. Anionenaustauschermembran,

$\mu_{K^+}^I, \mu_{K^+}^{II}$ das chemische Potential der Kaliumionen in den Phasen I und II und

$\mu_{Cl^-}^I, \mu_{Cl^-}^{II}$ das chemische Potential der Chloridionen in den Phasen I und II ist.

Bei dem Transport von einem Mol positiver elektrischer Ladung durch die Zelle von links nach rechts wird definitionsgemäß:

$$n_{K^+}^{KM} = \bar{t}_{K^+}^{KM},$$

$$n_{Cl^-}^{KM} = -\bar{t}_{Cl^-}^{KM},$$

$$n_{K^+}^{AM} = \bar{t}_{K^+}^{AM},$$

$$n_{Cl^-}^{AM} = -\bar{t}_{Cl^-}^{AM},$$

wobei $\bar{t}_i$ die mittleren Überföhrungszahlen der betreffenden Ionensorte in den Austauschermembranen bedeuten.

Eingesetzt in Gl. (4) erhält man:

$$\begin{aligned} \Delta G_{\text{Üb}} = & \bar{t}_{K^+}^{\text{KM}} (\mu_{K^+}^{\text{II}} - \mu_{K^+}^{\text{I}}) - \bar{t}_{Cl^-}^{\text{KM}} (\mu_{Cl^-}^{\text{II}} - \mu_{Cl^-}^{\text{I}}) \\ & + \bar{t}_{K^+}^{\text{AM}} (\mu_{K^+}^{\text{I}} - \mu_{K^+}^{\text{II}}) - \bar{t}_{Cl^-}^{\text{AM}} (\mu_{Cl^-}^{\text{I}} - \mu_{Cl^-}^{\text{II}}) , \end{aligned} \quad (5)$$

woraus sich ergibt :

$$\begin{aligned} \Delta G_{\text{Üb}} = & (\bar{t}_{K^+}^{\text{KM}} - \bar{t}_{K^+}^{\text{AM}}) \cdot (\mu_{K^+}^{\text{II}} - \mu_{K^+}^{\text{I}}) \\ & + (\bar{t}_{Cl^-}^{\text{AM}} - \bar{t}_{Cl^-}^{\text{KM}}) \cdot (\mu_{Cl^-}^{\text{II}} - \mu_{Cl^-}^{\text{I}}) . \end{aligned} \quad (6)$$

Durch Ersetzen der mittleren Gegenionenüberföhrungszahl in der Kationenaustauschermembran, $\bar{t}_{K^+}^{\text{KM}}$, bzw. in der Anionenaustauschermembran, $\bar{t}_{Cl^-}^{\text{AM}}$, durch die mittlere Überföhrungszahl der jeweiligen Coionen erhält man über die Beziehung :

$$\sum_i \bar{t}_i = 1 , \quad (7)$$

aus Gleichung Gl.(6) :

$$\begin{aligned} \Delta G_{\text{Üb}} = & (1 - \bar{t}_{\text{Cl}^-}^{\text{KM}} - \bar{t}_{\text{K}^+}^{\text{AM}}) \cdot (\mu_{\text{K}^+}^{\text{II}} - \mu_{\text{K}^+}^{\text{I}}) \\ & + (1 - \bar{t}_{\text{K}^+}^{\text{AM}} - \bar{t}_{\text{Cl}^-}^{\text{KM}}) \cdot (\mu_{\text{Cl}^-}^{\text{II}} - \mu_{\text{Cl}^-}^{\text{I}}) \end{aligned} \quad (8)$$

$$= (1 - \bar{t}_{\text{K}^+}^{\text{AM}} - \bar{t}_{\text{Cl}^-}^{\text{KM}}) \cdot \left[(\mu_{\text{K}^+}^{\text{II}} + \mu_{\text{Cl}^-}^{\text{II}}) - (\mu_{\text{K}^+}^{\text{I}} + \mu_{\text{Cl}^-}^{\text{I}}) \right] . \quad (9)$$

Unter Anwendung der Beziehung [48] :

$$\mu_{\text{KCl}} = \mu_{\text{K}^+} + \mu_{\text{Cl}^-} , \quad (10)$$

ergibt sich für Gleichung Gl.(9) :

$$\Delta G_{\text{Üb}} = (1 - \bar{t}_{\text{K}^+}^{\text{AM}} - \bar{t}_{\text{Cl}^-}^{\text{KM}}) \cdot (\mu_{\text{KCl}}^{\text{II}} - \mu_{\text{KCl}}^{\text{I}}) , \quad (11)$$

wobei $\mu_{\text{KCl}}^{\text{I}}$ und $\mu_{\text{KCl}}^{\text{II}}$ das chemische Potential von KCl in Phase I und II darstellen.

Definitionsgemäß gilt [48] :

$$\mu_{\text{KCl}} = \mu_{\text{KCl},0} + R \cdot T \cdot \ln a_{\text{KCl}} \quad , \quad (12)$$

wobei μ_{KCl} das chemische Potential von KCl,
 $\mu_{\text{KCl},0}$ das chemische Standardpotential von
 KCl und
 a_{KCl} die Aktivität von KCl ist.

Ferner gilt [48] :

$$a_{\text{KCl}} = a_{+}^2 \quad , \quad (13)$$

mit a_{+} mittlere Aktivität von KCl
 und:

$$\mu_{\text{KCl},0}^{\text{II}} = \mu_{\text{KCl},0}^{\text{I}} \quad . \quad (14)$$

Durch Einsetzen in Gl. (11) und unter Anwendung
 von Gl. (1) erhält man schließlich:

$$E = - \frac{2 R T}{F} \cdot (1 - \bar{t}_{\text{Cl}^-}^{\text{KM}} - \bar{t}_{\text{K}^+}^{\text{AM}}) \cdot \ln \frac{a_{+}^{\text{II}}}{a_{+}^{\text{I}}} \quad . \quad (15)$$

wobei E	die elektromotorische Kraft,
R	die universelle Gaskonstante,
T	die absolute Temperatur,
F	die Faraday-Konstante,
$\bar{t}_{Cl^-}^{KM}$	die mittlere Überföhrungszahl für Chlorid- ionen in der Kationenaustauschermembran,
$\bar{t}_{K^+}^{AM}$	die mittlere Überföhrungszahl für Kalium- ionen in der Anionenaustauschermembran und
a_{+}^I, a_{+}^{II}	die mittlere Aktivität von KCl in Phase I bzw. II bedeutet.

Gl. (15) gilt für eine galvanische Zelle mit Überföhrung mit nicht-idealen Membranen; für ideale Membranen ohne Coionenüberföhrung wird der Faktor in der Klammer vor dem Logarithmus gleich Eins. Für diesen Fall geht Gl. (15) über in:

$$E = - \frac{2 R T}{F} \cdot \ln \frac{a_{+}^{II}}{a_{+}^I} \quad . \quad (16)$$

In diesem Fall ist E somit gleich der elektromotorischen Kraft für je zwei selektive Kalium- und Chloridelektroden zwischen den Phasen I und II, d.h. jede Membrangrenzfläche verhält sich wie eine reversible Kalium- bzw. Chloridelektrode. Auf dieses Verhalten ist die Bezeichnung "Membranelektrode" [50] zurückzuführen.

Mit Gl. (15) ist eine Beziehung zwischen der meßbaren elektromotorischen Kraft E und den mittleren Aktivitäten des Salzes in Phase I und II gegeben. Sie bildet die theoretische Grundlage für die Messungen der vorliegenden Arbeit.

2.1.2 Bestimmung der mittleren Aktivität

Mit Hilfe der Nulltitrationmethode von SOLLNER [52] kann die mittlere Aktivität von KCl in Phase II bestimmt werden:

Die KCl-Aktivitäten in den beiden Phasen I werden in einem Bereich variiert, der die zu erwartende KCl-Aktivität in Phase II größenordnungsmäßig miteinschließt. Die Spannungsdifferenz an der Meßkette nimmt dabei positive und negative Werte an.

Aufgrund der Beziehung:

$$a_{\pm} = \gamma_{\pm} \cdot m_{\text{KCl}} \quad , \quad (17)$$

wobei $a_{\pm}$ die mittlere Aktivität von KCl,
 $\gamma_{\pm}$ der mittlere Aktivitätskoeffizient
 von KCl und
 m_{KCl} die Konzentration von KCl in Molen
 pro kg Wasser ist,

können die Aktivitäten in den beiden Phasen I durch Veränderung der KCl-Konzentration variiert werden. Die zugehörigen Werte für die Aktivitätskoeffizienten von KCl sind aus Tabellen [11] zu entnehmen.
 Für den Spannungswert $E=0$ gilt nach Gl. (15):

$$a_{\pm}^{\text{II}} = (a_{\pm}^{\text{I}})_{E=0} \quad (18)$$

wobei a_{-}^{II} die mittlere Aktivität von KCl in Phase II
und
 $(a_{-}^{I})_{E=0}$ die mittlere Aktivität von KCl in der Phase I, für die E gleich Null wird, bedeutet.

$(a_{-}^{I})_{E=0}$ ist die Meßgröße; sie kann graphisch (siehe Abb. 8, Seite 44) oder rechnerisch mit linearer Regression bestimmt werden.

2.2 Herstellung der Hämoglobin-KCl-Lösungen

2.2.1 Hämoglobin-Stammlösung

Das verwendete Hämoglobin stammte aus Rindererythrozyten. Die Aufbereitung geschah in Anlehnung an die Methode von DRABKIN [16] und HINSON [25]. Etwa dreißig Minuten, spätestens jedoch eine Stunde nach Blutentnahme wurde mit dem Abzentrifugieren des Plasmas begonnen (CHRIST, Kühlzentrifuge; Typ: JUNIOR II KS; 40 Min. bei 2600 rpm, entsprechend 1950 g). Die Temperatur betrug 2-4°C. Das überstehende, fast wasserklare Plasma und die gelblich-weiße Leukozytenschicht wurden abgesaugt. Die dickflüssige Erythrozytensuspension wurde dann einmal mit 0.9%-iger und dreimal mit 1.2%-iger NaCl-Lösung gewaschen bei einem Verdünnungsverhältnis von Erythrozyten-Suspension zu Waschflüssigkeit von jeweils etwa 1:10. Die verwendeten Waschlösungen (NaCl p.A.; MERCK) wurden mit demineralisiertem Wasser angesetzt und eine halbe Stunde mit Stickstoff begast. *)

*) Die von DRABKIN [16] erwähnte Zugabe von 0.0025 Molen $AlCl_3$ zur Waschlösung führte bei unseren Untersuchungen regelmäßig zur Koagulation der Erythrozyten und wurde daher nicht verwendet.

Um eine möglichst hohe Ausgangskonzentration der Hämoglobin-Stammlösung zu erhalten, wurden die Erythrozyten nach der letzten Wäsche in einer Ultrazentrifuge (BECKMANN, SPINCO L2, Rotor 19; 90 Min., 19000 rpm entsprechend 17000-53000 g, 4°C) dicht gepackt. Die gepackten Erythrozyten zeigten gallertige Konsistenz.

Zur Hämolyse wurden die dichtgepackten Erythrozyten mit bidestilliertem Wasser und Toluol im Volumenverhältnis von 1 : 1.2 : 0.4 gemischt, das Hämolysat anschließend bei Raumtemperatur ein bis zwei Stunden geschüttelt oder sechs bis acht Stunden im Eisbad kräftig gerührt. Die Verwendung von Toluol hatte für das Hämoglobinmolekül keine nachweisbare denaturierende Wirkung zur Folge; nach HINSON und McMEEKIN [25] wirkt sich die Gegenwart von Toluol sogar günstig auf die Hämoglobinkristallbildung aus.

Durch anschließendes, längeres Zentrifugieren (2600 rpm, 90 Min.) der Hämoglobin-Lösung in der Kühlzentrifuge ließen sich Toluol und der überwiegende Teil des Stromas leicht entfernen. Durch nachfolgendes Ultrazentrifugieren (BECKMANN, SPINCO L2, Rotor 30, 90 Min., 30 000 rpm, entspr. 50000 - 106000 g) konnten schließlich noch kleinere Membranpartikeln abgetrennt werden. Man erhielt eine weinrote Hämoglobinlösung in einer Konzentration von 13-17 Gew.-%. Die mikroskopische Kontrolle im Dunkelfeld zeigte eine durchgehend klare und homogene Lösung.

2.2.2 Diafiltration der Hämoglobin-Stammlösung

Quantitatives Ersetzen der Fremdsalze in der Hämoglobin-Stammlösung durch 0,1 molale Kaliumchloridlösung und gleichzeitiges Aufkonzentrieren des Hämoglobins erfolgte durch kontinuierliche Ultrafiltration ("Diafiltration"), anstelle der herkömmlichen Dialyse, was mit erheblicher Zeitersparnis und gesteigerter Effektivität des Austauschprozesses verbunden war. Das hierzu verwendete Gerät stammte von der Firma AMICON Corp. (siehe Abb. 1); Zellen mit 200 ml (Typ 202, eff. Membranfläche 27.5 cm^2) und 400 ml (Typ 404, eff. Membranfläche 39.2 cm^2) Fassungsvermögen wurden verwendet.

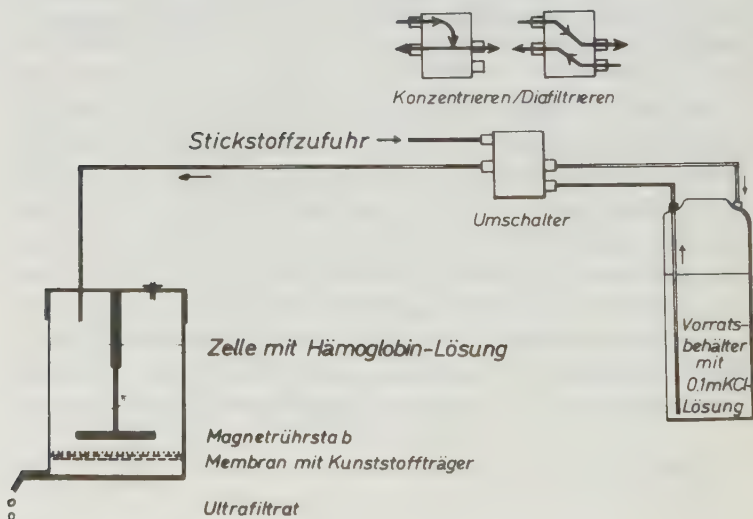


Abb. 1: Schematische Darstellung des Ultrafiltrationsgerätes der Fa. AMICON Corp..
(Erklärung im Text).

Bei der Diafiltration wird gereinigtes Stickstoffgas mit etwa zwei Atmosphären Überdruck in einen Vorratsbehälter und hieraus die eingestellte Salzlösung in die Filtrationszelle gepreßt, die das Präparat enthält. Nach Einstellung des Druckgleichgewichtes entspricht das abgepreßte Filtratvolumen jeweils dem Zulauf aus dem Reservoir. Bei der Aufkonzentrierung des Präparates wird Stickstoff direkt in die Filtrationszelle eingepreßt.

Zum Salzaustausch wurde eine 0,1 molale KCl-Lösung verwendet (7.45600 g KCl auf 1000,00 g H₂O bidest.). Diese Lösung wurde vor dem Einfüllen in das Reservoir 30 Min. unter kräftigem Rühren entgast (KCl p.A., MERCK).

Die verwendeten DIAFLO-Membranen der PM-Serie (Fa. AMICON Corp., PM-10 und PM-30) sind aus inertem und nicht denaturierend wirkendem Kunststoff gefertigt und zeigen keinerlei Bindungsvermögen für einfache Salze und deren Ionen. Gegenüber der PM-10 besitzt die Membran PM-30 eine höhere Durchflußrate und ist durchlässig für globuläre Moleküle des Molekulargewichtes bis 30 000; sie war für unsere Arbeiten mit Hämoglobin (MG = 64500, [4]) auch hinsichtlich ihrer Beständigkeit gegenüber anfangs vorhandenen Toluolresten am besten geeignet. Die maximale Durchflußrate für die Membran PM-30 wurde bei einem Druck von 30-40 psi, entsprechend 2-2.8 atü, erreicht; sie betrug bei einer 10 bis 12%-igen Hämoglobinlösung etwa 0.8 ml/Min..

Während des Filtrationsvorganges wurde die Hämoglobininlösung mit einem frei hängenden Magnetrührer dicht über der Membranoberfläche bei niedriger Drehzahl gerührt. Die gesamte Apparatur einschließlich Rührwerk war im Kühlschrank installiert; die Temperatur betrug im Mittel + 4°C.

Für den Fall, daß alle diafiltrierbaren Salzionen und sonstige "Verunreinigungen" wie z.B. Toluol mit einem Molekulargewicht unter 30000 ungehindert die Membranporen passieren können, ohne in irgendeiner Form an die Membran gebunden zu werden, gilt für den "Einwascheffekt" eines bestimmten Salzes während der Diafiltration:

$$\frac{C_w - C}{C_w} = e^{-\frac{V_o}{V_w}}, \quad (19)$$

wobei C_w die Konzentration in Mol pro l Lösung der definierten Salzlösung im Vorratsbehälter (einzuwaschende Konzentration),
 V_w das Volumen an durchgeflossener, abfiltrierter Salzlösung,
 C die Konzentration (Mol/l Lösung) an KCl in der Proteinlösung nach Durchfluß von V_w und
 V_o das Volumen der eingefüllten Proteinlösung ist.

Nach Durchfluß eines Volumens Waschflüssigkeit, das dem Zehnfachen des Volumens der Proteinlösung in der Diafiltrationszelle entspricht, hat die eingestellte Salzkonzentration der Proteinlösung 99,997% der Salzkonzentration der Waschlösung erreicht und sogar überschritten; sie besitzt dann praktisch den Sollwert von 0.1 Mol KCl pro kg Wasser; gleichzeitig sinkt die Konzentration

der permeablen Fremdstoffe (Na^+ , HCO_3^- , Kohlenhydrate, Toluol) auf $\leq 0.003\%$ ihres Anfangswertes (zur KCl-Konzentrationskontrolle siehe Seite 24 u. 28, Abschn. 2.3.5, 2.3.6).

Abgesehen von dem beschriebenen Salzaustausch wurde die Ultrafiltration auch zur Konzentrierung der Proteinlösung verwendet; (siehe Funktionsbilder zum Umschalter in Abb. 1); die eingestellten Hämoglobinkonzentrationen betrugen 6 bis 45 Gew.-%.

2.3 Analyse der Hämoglobin-KCl-Lösung

2.3.1 Bestimmung der Hämoglobinkonzentration

Die Hämoglobinkonzentration wurde mit Hilfe der Trockengewichtsbestimmung ermittelt. Hierzu wurden 2-3 ml der Hämoglobin-KCl-Lösung bei etwa 110°C getrocknet, bis Gewichtskonstanz nach etwa 48 Stunden erreicht war.

Die Molalität an Hämoglobin wurde berechnet nach der Gleichung:

$$m_{\text{Hb}} = \frac{\xi \cdot 1000}{(1 - \xi) \cdot G_{\text{Hb}}}, \quad (20)$$

wobei m_{Hb} die Anzahl der Mole Hämoglobin pro kg Wasser,
 ξ der Hämoglobintrockengewichtsanteil und
 G_{Hb} das Molekulargewicht des Hämoglobins (MG=64500, [4]) ist.

Die Molalitäten lagen in einem Bereich von 0.94 bis 12.95×10^{-3} Mol Hämoglobin pro kg Wasser. Der Fehler der Proteinkonzentrationsbestimmung betrug $\pm 0.5 \%$.

2.3.2 Bestimmung des pH-Wertes

Zur Bestimmung des pH-Wertes der Hämoglobin-KCl-Lösung diente ein RADIOMETER-pH-Meter (Typ 25 SE der Fa. RADIOMETER, Kopenhagen) mit einer Einstabglaselektrodenkette. Der pH-Wert der Hämoglobin-KCl-Lösungen betrug bei 23°C 7.15 ± 0.05 pH-Einheiten unabhängig von der Hämoglobinkonzentration.

2.3.3 Extinktionsmessung

Die Hämoglobin-KCl-Lösungen zeigten sechs Tage nach Beginn der Aufbereitung das Spektrum von Oxyhämoglobin ($\text{Hb} \cdot \text{O}_2$; siehe Abb.2) mit Extinktionsmaxima bei 414 nm (Soret-Bande), 540 und 578 nm [2]. Methämoglobin mit Extinktionsmaxima von 630 (pH 6-8), 404 und 500 nm war in den Lösungen nicht nachweisbar.

Die Extinktionsmessungen wurden mit 0.02 %-iger Hämoglobininlösung durchgeführt. Verdünnungen selbst starker konzentrierter Hämoglobininlösungen (z.B. 45 %-ig*) zeigten ein normales $\text{Hb} \cdot \text{O}_2$ -Spektrum.

Denaturierung im Bereich der prosthetischen Gruppe und an dieser selbst war somit nicht eingetreten.

*) Nach Untersuchungen von DRABKIN u. HINSON [17] und JOPE [26] ist das Lambert-Beer'sche Gesetz bei Hämoglobininlösungen bis zu Konzentrationen von über 40 Gew.-% erfüllt, was bedeutet, daß auch hochkonzentrierte Hämoglobininlösungen als echte Lösungen behandelt werden können.

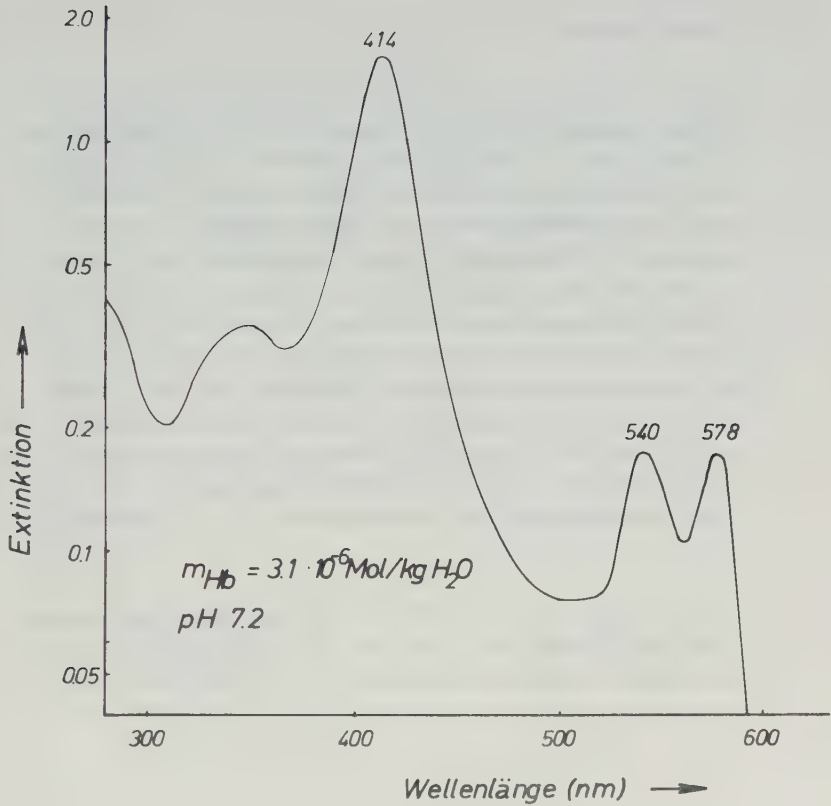


Abb. 2: Extinktionskurve der Meßlösung (Verdünnung etwa 1:1000): Dekadischer Logarithmus der Extinktion in Abhängigkeit von der Wellenlänge. Hämoglobinkonzentration: $3.1 \cdot 10^{-6}$ Mol pro kg Wasser (entsprechend 0.02 Gew.-%); pH 7.15 .

2.3.4 Gelfiltration^{*)}

Die Untersuchung auf mögliche, bei der Aufbereitung gesetzte grobe Proteinschäden wie Bruchstücke oder Aggregationen, erfolgte mittels Gelfiltration. Hierzu diente eine zwei Meter lange, wassergekühlte (Temp. ca. 2°C) Glassäule, die SEPHADEX-Gel G 150 enthielt. Die Säule war mit 0.1 molaler KCl-Lösung, die zuvor sterilisiert und entgast wurde, drei Tage äquilibriert worden. Jeweils 6 ml einer 0.8-0.9 %-igen Hämoglobinlösung wurden sofort nach Abschluß der Aufbereitung aufgetragen. Das Ergebnis war in jedem Falle eine einzige Fraktion, die im Chromatogramm (siehe Abb. 3, Seite 23) als steiler, annähernd symmetrischer Peak erschien. Daraus darf geschlossen werden, daß zumindest keine ausgeprägte Denaturierung, Molekülbrüche oder Aggregationen des Hämoglobinmoleküls während der Aufbereitung eintraten.

Aus der Lage des Peaks konnte auf ein Molekulargewicht der betreffenden Fraktion von 65 000 geschlossen werden, bei einer Halbwertsbreite von 25 000 Molekulargewichtseinheiten.

^{*)} Für die freundliche Unterstützung bei der Durchführung der Gel-Filtration danke ich Frau Dr. H. Schüßler und Herrn Dr. K. Kunigk.

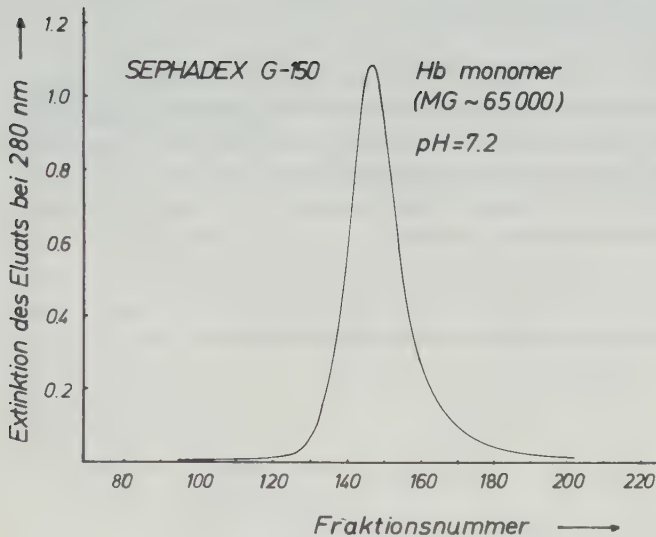


Abb.3: Gel-Chromatogramm der Hämoglobinlösung:
Extinktion des Eluats bei 280 nm in Abhängigkeit
vom Elutionsvolumen (Fraktionsnummer).
SEPHADEX-G-150-Säule; Elution mit 0.1 molaler
KCl-Lösung unter Zusatz von 0.02 % Natriumazid;
pH 7.15 ; Temperatur 4°C .

2.3.5 Bestimmung der Chloridkonzentration

Die Gesamtmenge an Chloridionen in der Hämoglobin-KCl-Lösung wurde mit dem Chlortitrator nach E. COTLOVE [12] der Fa. AMINCO bestimmt.

Meßproben und Standardlösung (0.1 molale KCl-Lösung) wurden mit einer HNO_3 -Eisessiglösung im Verhältnis 1:40 verdünnt. Die Titration wurde im hohen Geschwindigkeitsbereich durchgeführt ("High-rate"-Einstellung am Gerät). Der Indikator-Nullstrom lag in der Regel im Normalbereich unter $5 \mu\text{A}$.

Die Berechnung der Chloridkonzentration in der Hämoglobin-KCl-Lösung erfolgte nach der Gleichung:

$$m_{\text{Cl}^-} = \frac{\left(\frac{\tau - \tau_0}{G} \right)_{\text{Pr}} \cdot f_{\text{VPr}} \cdot 1000}{K \cdot \left(1 - f \right)} \quad , \quad (21)$$

wobei m_{Cl^-} die Konzentration der Chloridionen in Molen pro kg Wasser,

τ die Bruttotitrationszeit der Probe in Sekunden,

τ_0 die Leerwerttitrationszeit in Sekunden,

G das Probengewicht in Gramm,

f_{VPr} der Verdünnungsfaktor der Probe,

f der Trockengewichtsanteil an Hämoglobin der Hämoglobin-KCl-Lösung und

K der Eichfaktor in $\left[\frac{\text{sec}}{\text{Mol Cl}^-} \right]$ ist .

Der Eichfaktor K ist gegeben durch:

$$K = \left(\frac{\tau - \tau_0}{G} \right)_{St} \cdot f_{V_{St}} \cdot 1.0075 \cdot 10^4 ,$$

mit $\left(\frac{\tau - \tau_0}{G} \right)_{St}$ der Nettotitrationszeit des Standards
und

$f_{V_{St}}$ dem Verdünnungsfaktor des Standards.

Der Wert des Eichfaktors K lag im Bereich des Richtwertes und betrug $(3.85 \pm 0.08) \cdot 10^6$ in $\left[\frac{\text{sec}}{\text{Mol Cl}^-} \right]$.

Jede Meßreihe pro Hämoglobinkonzentration umfaßte jeweils vier Proben Standard und Meßlösung, die abwechselnd mit den zugehörigen Leerwerten titriert wurden. Die vier Einzelergebnisse je Meßreihe wurden gemittelt. Die Genauigkeit der Messung lag bei etwa $\pm 1\%$.

Mit Hilfe einer Inkrementmethode ließ sich der Einfluß der Hämoglobinkonzentration auf die Chlortitrationswerte untersuchen. Hierzu wurden Standard- und Hämoglobin-KCl-Lösung in bestimmten Verhältnissen verdünnt und die Chloridkonzentration bestimmt. Die Inkrementmethode wurde mit einer 36%-igen Hämoglobin-KCl-Lösung durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 zusammengefaßt:

Tabelle 1

Konzentrationsinkremente zur Überprüfung des Hämoglobineinflusses auf die Chloridkonzentrationsbestimmung:

Verdünnungsfaktor	m_{Cl^-} in Mol/kg H_2O
21.44	0.1066
42.8	0.1067
61.3	0.1067
84.9	0.1089

Die maximale Abweichung der Titrationswerte untereinander betrug $\leq 2 \%$. Ein verfälschender Einfluß des Hämoglobins konnte somit ausgeschlossen werden.

Auf die Zugabe von Natrium-Perborat zur Oxydation eventuell störender SH-Gruppen am Hämoglobinmolekül konnte verzichtet werden, da die Gegenwart von Natrium-Perborat keine signifikante Änderung der Titrationswerte erbrachte. Ein Einfluß der SH-Gruppen auf die Chlorid-Bestimmung war somit nicht nachweisbar.

Wie schon aus Tabelle 1 und weiteren Meßergebnissen hervorgeht, lagen die Chloridkonzentrationen bei den meisten Lösungen über dem erwarteten Wert von 0.1 Mol pro kg Wasser der eingewaschenen KCl-Lösung (max. 12 %). Der gefundene Cl^- -Überschuß stieg zudem mit der Hämoglobinkonzentration an.

Die Kaliumkonzentration hingegen zeigte innerhalb der Fehlergrenze der Methode keine signifikante Abweichung von dem erwarteten Wert (s.u.).

Um auszuschließen, daß die zu hohen Cl^- -Konzentrationswerte durch systematische Fehler bei der Chloridbestimmung bedingt sind, wurde Hämoglobin in völlig entsalzte Hämoglobinlösung eingewogen; die jetzt gemessenen Chloridwerte stimmten mit der eingewogenen Chloridmenge und dem Kaliumwert überein. Das zeigt, daß die bei der Diafiltration eingestellten und mit dem Chlorid-Titrator bestimmten Cl^- -Konzentrationswerte in der Hämoglobinlösung auf Eigenschaften des Hämoglobinpräparates zurückzuführen sind, wie auf eine spezifische Bindung von ca. zwei bis drei Cl^- -Ionen pro Hämoglobinmolekül (vergl. auch Abschn. 3.4).

2.3.6 Bestimmung der Kalium-Konzentration

Die Konzentration von Kaliumionen in der Hämoglobin-KCl-Lösung wurde mit dem Flammenphotometer EPPENDORF bestimmt. Die Hämoglobin-KCl-Lösung wurde hierzu 1:1000 mit demineralisiertem Wasser verdünnt und die Emission des Kaliums bei 767 nm gemessen. Als Standard diente eine KCl-Lösung in einer Konzentration von 1×10^{-4} Mol pro kg Wasser (≈ 7.456 mg/l). Die Kaliumbestimmung erfolgte somit in einem Konzentrationsbereich von 0.2–20 mg/ml, der bei der Verwendung von Propan als Brenngas am günstigsten ist [18].

Die Hämoglobin-KCl-Lösung wurde nach Verdünnung 30 Min. gerührt und anschließend filtriert, um Anzeigeschwankungen durch Proteinflocken vorzubeugen. Alle Werte wurden mit dem Potentiometer-Schreiber SERVOGOR der Fa. METRAWATT, Nürnberg, aufgezeichnet. Die Linearität der Anzeige am Flammenphotometer wurde mittels einer Verdünnungsreihe reiner KCl-Lösungen überprüft. Wegen der zeitlichen Änderung der Anzeigewerte wurden je Konzentrationsstufe intermittierend viermal die Anzeigewerte für Standard und Meßlösung registriert und der Anzeigewert der Meßlösung in Prozent des interpolierten Anzeigewertes für die Standardlösung ermittelt; dabei wurde zu Beginn der Meßreihe der Anzeigewert des Standards auf den Wert 100 eingestellt; im Verlauf einer Meßreihe sank dieser Wert um max. etwa 10% ab.

Die gemittelten Anzeigewerte wurden in Abhängigkeit von der Konzentration der Probe jeweils in Prozent der Konzentration des Standards angegeben (siehe Abb. 4). Im Kaliumkonzentrationsbereich der Probe von 30 – 100% ergab sich innerhalb der Genauigkeit der Methode eine Gerade. Die Steigung der Ausgleichsgeraden betrug 1.029.

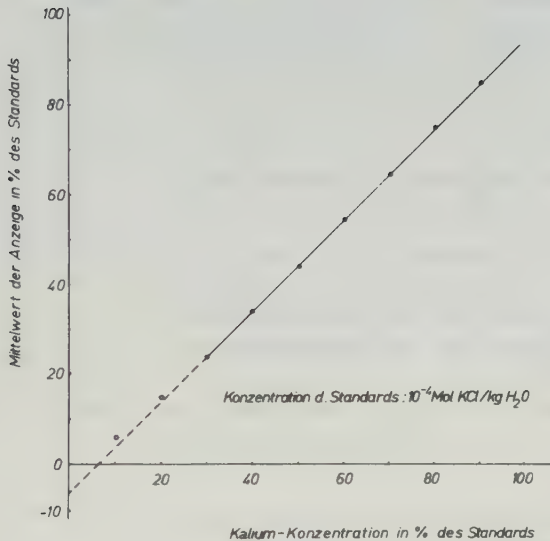


Abb. 4: Linearität der Anzeigewerte von Kalium am
Flammenphotometer:
Mittlerer Anzeigewert von KCl-Lösungen in
Prozent des Standards in Abhängigkeit von der
Kaliumkonzentration der Lösung in Prozent des
Standards.
Konzentration des Standards: 10^{-4} Mol KCl pro
kg Wasser. (Flammenphotometer "EPPENDORF" 700
der Fa. NETHELER und HINZ GmbH, Hamburg).

Aus der Abb. 4 (Ausgleichsgerade) erkennt man, daß die Anzeigewerte zu niedrig liegen .

Aus der Ausgleichsgeraden in Abb. 4 wurden daher die Korrekturfaktoren für die relativen Anzeigewerte errechnet:

$$f_{\text{korr}} = \frac{\left(\frac{m_P}{m_S} \right)}{\left(\frac{A_P}{A_S} \right)} \quad , \quad (22)$$

wobei m_P, m_S die molale KCl-Konzentration der Probe bzw. des Standards ist
und
 A_P, A_S die gemittelten Anzeigewerte der Probe bzw. des Standards bedeuten.

m_P / m_S ist somit die relative Molalität der Probe, bezogen auf die Molalität des Standards,
 A_P / A_S der relative Anzeigewert der Probe, bezogen auf den Anzeigewert des Standards.

Die Berechnung der Kaliumkonzentration in der Hämoglobin-KCl-Lösung erfolgte nach der Gleichung:

$$m_{K^+}^{\text{Hb}} = \frac{f_{\text{korr}} \cdot \left(\frac{A_P}{A_S} \right) \cdot m_S \cdot f_v}{\left(1 - \frac{f_v}{f} \right)} \quad , \quad (23)$$

wobei $m_{K^+}^{Hb}$ die molale Kaliumkonzentration in
der Hämoglobin-KCl-Lösung,
 f_{korrr} der Korrekturfaktor,
 A_P / A_S der Mittelwert des relativen Anzeige-
wertes der Probe,
 m_S die molale KCl-Konzentration des
Standards,
 f_V der Verdünnungsfaktor für die Hämoglobin-KCl-Lösung und
 ξ der Hämoglobintrockengewichtsanteil
bedeutet.

Die Genauigkeit der Kaliumbestimmung lag bei ca. $\pm 1 \%$.

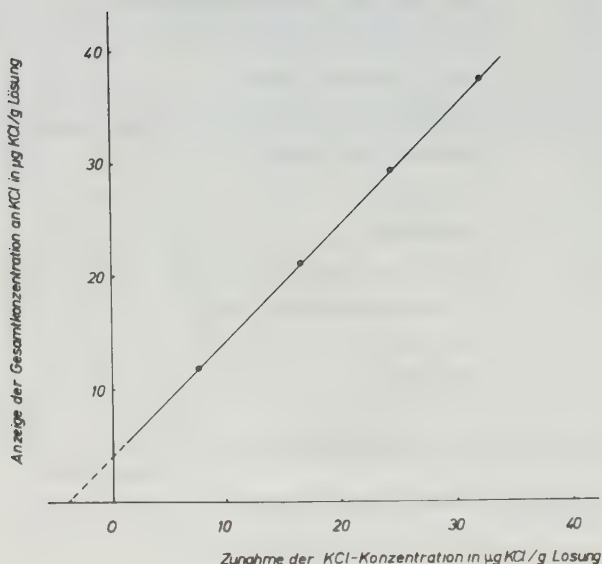


Abb. 5: Überprüfung des Einflusses des Hämoglobins auf den Kalium-Anzeigewert am Flammenphotometer:
Angezeigte Gesamtkonzentration an KCl in Abhängigkeit von der Zunahme der KCl-Konzentration;
Ausgangslösung: 27.4 Gew.-% Hämoglobin, 0.107 Mol KCl pro kg Wasser, 1:1000 verdünnt;
Konzentration der verwendeten Standardlösung:
37.50 μg pro g Lösung entsprechend $5 \cdot 10^{-5}$ Mol KCl pro kg Wasser.
Eine Zunahme der KCl-Konzentration von 10 μg KCl pro g Lösung entspricht einer Molalitätszunahme von $1.341 \cdot 10^{-4}$ Mol KCl pro kg Wasser.
(Flammenphotometer "EPPENDORF" 700)

Der Einfluß von Hämoglobin auf die Kaliumanzeige am Flammenphotometer ließ sich an Hand einer Inkrementmethode untersuchen; hierzu wurde eine konzentrierte Hämoglobin-KCl-Lösung (27% Hämoglobin, 0.107 Mol KCl pro kg Wasser) 1:1000 verdünnt und nach Zuwägen bestimmter KCl-Mengen die vom Flammenphotometer angezeigte Konzentration, berechnet aus dem Anzeigewert und der Konzentration des Standards, in Abhängigkeit von der berechneten Zunahme der Kaliumkonzentration, bestimmt (s. Abb. 5). Es ergab sich auch hierbei eine Gerade, deren Steigung 1.030 betrug und somit innerhalb der Genauigkeit der Methode mit der der Eichkurve (siehe Abb. 4) gut übereinstimmte.

Der Achsenabschnitt auf der Ordinate entspricht der KCl-Konzentration in der Ausgangslösung, wenn man den in diesem Bereich relativ hohen Korrekturfaktor (s. Gl. (22), S. 30) berücksichtigt.

Ein Einfluß des Hämoglobins auf die Kaliumanzeige konnte innerhalb der gegebenen Genauigkeit somit ausgeschlossen werden.

2.4 Messung der mittleren Aktivität

2.4.1 Meßanordnung

Der mittlere Aktivitätskoeffizient von KCl wurde nach der Methode von PFISTER [43] mit Ionenaustauscher-Membranelektroden in einer Dreikammerzelle gemessen. In Abb. 6 ist die Meßanordnung schematisch dargestellt.

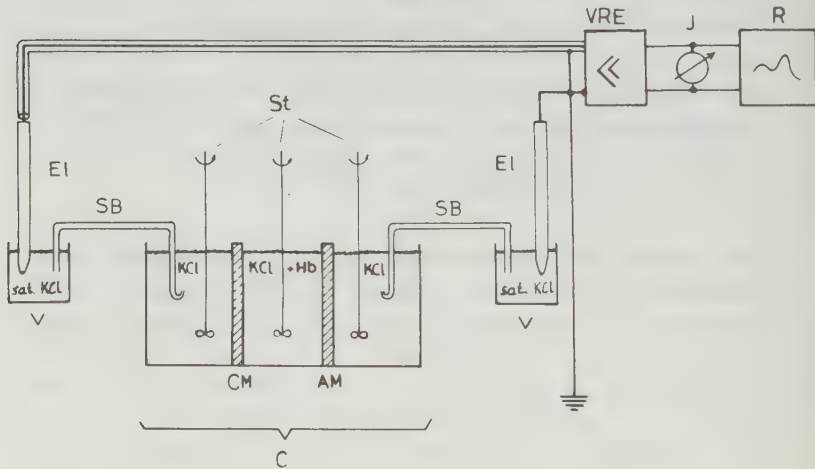


Abb. 6: Schematischer Aufbau der Meßanordnung zur Bestimmung der mittleren Aktivitäten von KCl in Hämoglobin (Hb)-KCl-Lösungen mit Ionenaustauscher-Membranelektroden:

- C : Dreikammer-Meßzelle;
- CM : Kationen-Austauschermembran;
- AM : Anionen-Austauschermembran;
- St : Rührvorrichtung;
- SB : Salzbrücken (KCl, gesättigt, in Agar-Agar);
- V : Vorratsgefäß (KCl, gesättigt);
- El : Thalamid-Elektroden;
- VRE: Meßverstärker;
- J : Anzeigeinstrument;
- R : Potentiometerschreiber.

Die verwendete Meßzelle (s. Abb. 6 u.7) ist durch eine Kationen- und eine Anionenaustauschermembran in drei Kammern unterteilt. Die mittlere Kammer enthält die Hämoglobin-KCl-Lösung, die Außenkammern die KCl-Titrationslösungen jeweils gleicher Konzentration. In die Außenkammern tauchen die Salzbrücken ein, die mit zwei Thalamidelektroden in Verbindung stehen. Die Spannung an den Thalamidelektroden wird mit einem Schwingkondensator-Meßverstärker abgegriffen. Zur Abschirmung gegen äußere elektrische Felder war der gesamte Meßaufbau - außer dem Meßverstärker - durch einen Faraday'schen Käfig aus Maschendraht abgeschirmt. An den Meßverstärker war ein Kompensations-schreiber (SERVOGOR) der Firma METRAWATT angeschlossen. Für die drei Meßkammern war ein regelbares Rührwerk installiert.

2.4.2 Meßzelle

In Abb. 7 (Seite 37) ist die Dreikammerzelle [43] im Aufriß dargestellt. Zur Fertigung der Zelle *) wurde Plexiglas verwendet. Das Material war zuvor entspannt worden. Die wasserdichte Verbindung der drei Kammern erfolgte mit einem speziellen Polymerisationskleber. Die drei Kammern wurden über Flansche miteinander verschraubt.

Die einander zugekehrten Kammerfenster sind durch Austauschermembranen dicht gegeneinander verschlossen; zur Abdichtung dienen Hartgummiringe. Die Fensterfläche beträgt ungefähr $0,12 \text{ cm}^2$ pro Fenster. Die beiden rechts und links angefügten Kamme dienen zur Elektrodenhalterung; sie stehen über Bohrungen von $2 \text{ mm } \varnothing$ mit den Außenkammern in Verbindung.

Jede Kammer (Volumen etwa 4 cm^3) trägt einen Einfüllstutzen, der während der Messung verschlossen ist. Der konische Verschuß besitzt Durchführungen für die Rührstäbe und die Stickstoffbegasung.

*) Die Herstellung der Zelle besorgte Herr Lehmeier; für seine hilfsbereite Unterstützung in allen technischen Fragen möchte ich ihm an dieser Stelle danken.

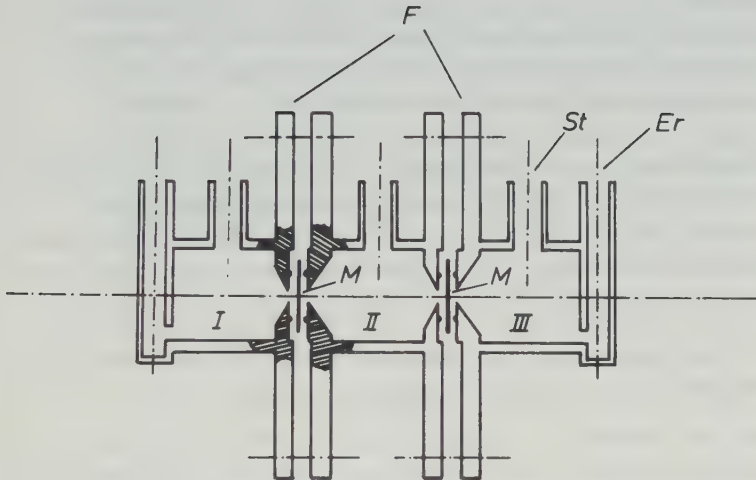


Abb. 7: Längsschnitt durch eine Dreikammer-Meßzelle
(schematisch):

Querschnitt: zylindrisch;

F: Flansche; St: Einfüllstutzen;

Er: Elektrodenräume; M: Ionenaustauscher-
Membranen; I, II, III : Meßkammern.

Material: Plexiglas.

2.4.3 Ionenaustauschermembranen

Die Ionenaustauschermembranen stammten von der Firma IONICS Inc., Watertown, Mass., U.S.A.. Diese Membranen sind aus Polystyrol hergestellt und mit Divinylbenzol vernetzt. Zur mechanischen Stabilität besitzen sie zusätzlich ein Stützgewebe aus "DYNEL".

Die Kationenaustauschermembran (Typ: NEPTON CR-61) trägt SO_3^- -Festionen. Die Anionenaustauschermembran (Typ: NEPTON AR-111) besitzt tertiäre und quarternäre Ammoniumbasen als Festionen. Die Membranen haben eine Dicke von ca. 0,7 mm.

Vor Gebrauch waren die Membranen in einer KCl-Lösung mit Kalium- bzw. Chloridionen beladen worden.

Um Austrocknung zu vermeiden und einen gleichmäßigen Quellungszustand zu gewährleisten, wurden die Membranen in 0,1 molaler KCl-Lösung aufbewahrt und bei 4°C gelagert. Die Konzentration der KCl-Lösung war hierbei so gewählt worden, daß sie im KCl-Konzentrationsbereich der Titrationslösungen und der Hämoglobin-KCl-Lösung lagen.

Die verwendeten Austauschermembranen weisen eine hohe Festionenkonzentration auf; sie beträgt etwa 4 Äquival./kg H_2O für die Kationenaustauschermembran (CR-61) und etwa 2 Äquival./kg H_2O für die Anionenaustauschermembran (AR-111) [20,44,43]. Die Transportzahl für Wasser, $T_{\text{H}_2\text{O}}$, bei Gleichgewicht der Membran mit 0,1M KCl, liegt bei 8 Molen Wasser pro Faraday transportierter elektrischer Ladung [20,54,55]. Die Überföhrungszahl für die Coionen, $\bar{t}_c$, beträgt im untersuchten Konzentrationsbereich 0,03 bis 0,08 [43].

Eine Diffusion von Proteinmolekülen durch die Membran findet nicht statt [44].

2.4.4 Elektroden

Als Elektroden dienten Thalamid-Bezugselektroden der Fa. SCHOTT u.GEN., Mainz. Um die beträchtliche Diffusion von KCl aus den Elektrodenfritten in die Titrationslösungen zu vermeiden, wurden die Bezugselektroden in Vorratsgefäße mit gesättigter KCl-Lösung eingetaucht. Die elektrisch leitende Verbindung zu den Titrationslösungen der Außenkammern geschah durch die KCl-Brücken (siehe Abb.6).

2.4.5 KCl-Brücken

Die KCl-Brücken bestanden aus PVC-Schläuchen mit einem Innendurchmesser von ca. 1 mm ; sie waren mit gesättigter KCl-Lösung gefüllt und standen in Verbindung mit der gesättigten KCl-Lösung, in die die Thalamid-Bezugselektroden eintauchten. Gegen die Titrationslösungen waren sie durch Glaskapillaren verschlossen, deren Spitzen bis zu einem Innendurchmesser von etwa 100 μ ausgezogen und nach oben umgebogen waren, wodurch Diffusion und Konvektion der gesättigten KCl-Lösung in die KCl-Titrationslösung verringert werden konnte. Die Kapillaren waren mit 1.2 %-igem Agar-Agar-Gel (DIFCO, purified agar) gefüllt, das vorher in heißer, gesättigter KCl-Lösung aufgequollen war.

Der Übertritt von KCl-Lösung aus den Elektrodenspitzen in die Titrationslösung aufgrund von Diffusion, Konvektion und Strömung ließ sich jedoch nicht vollständig unterdrücken. Nach Messungen von PFISTER [44] bleibt dieser Einfluß auf die Konzentration der Titrationslösungen jedoch unter 1 % .

2.4.6 Elektrische Meßgeräte

Zur Messung der EMK wurde ein Gleichspannungsmeßverstärker der Fa. FRIESEKE & HOEPFNER (Typ: FHT 408A) verwendet. Der Eingangswiderstand am Schwingkondensator betrug 10^{11} Ohm, die Eingangskapazität 15 pF. Die EMK-Messung konnte somit praktisch stromlos erfolgen.

Der Innenwiderstand der gesamten Meßkette, gemessen zwischen den Thalamid-Elektroden, betrug $2 \cdot 10^5$ bis $3 \cdot 10^5$ Ohm je nach Konzentration und Zusammensetzung der Meßlösungen und Art der verwendeten KCl-Brücken.

Geringe Spannungsschwankungen, die auf das Eigenrauschen des Meßgerätes und auf den Motor des Rührwerkes zurückzuführen sind, lagen innerhalb der Ablesegenauigkeit; sie betrug ± 0.03 mV in 10-mV-Bereich.

Während des gesamten Meßvorganges wurde die Spannung mit dem Kompensations-Schreiber "SERVOGOR" der Fa. METRAWATT registriert. Auch hier lag die Ablesegenauigkeit im 10-mV-Bereich bei ± 0.03 mV.

Traten EMK-Werte > 10 mV auf, so wurde die Spannung an Schreiber und Ablesegerät mit dem eingebauten Kompensator des FHT 408A soweit kompensiert, daß die Registrierung wieder im 10-mV-Bereich erfolgen konnte. Die Genauigkeit der Einstellung der Kompensationsspannung betrug im ungünstigsten Fall ± 0.1 mV. Zusammen mit der Ablesegenauigkeit ergibt sich eine maximale Meßunsicherheit von ± 0.15 mV.

2.4.7 Titrationslösungen

Die Konzentration der zur Titration verwendeten Elektrolytlösungen lagen in einem Bereich von 0,07 bis 0,15 Mol KCl pro kg Wasser; sie wurden mit bidestilliertem Wasser angesetzt. Die Genauigkeit der eingestellten KCl-Konzentration betrug $\leq 1 \%$.

Die durch den CO_2 -Gehalt der Luft verursachte Erhöhung der H^+ -Ionen-Konzentration ergab einen durchschnittlichen pH-Wert der KCl-Lösungen von 5,6 pH-Einheiten. In jedem Fall blieb die H^+ - bzw. OH^- -Konzentration in einem Bereich, der gegenüber der KCl-Konzentration von 0,1 Mol / kg Wasser vernachlässigbar klein war und daher die Meßwerte innerhalb der apparativen Meßgenauigkeit nicht beeinflusste [43] .

2.4.8 Meßvorgang

Wie aus Abb. 6 (Seite 34) hervorgeht, wurden die Titrationslösungen paarweise in die beiden Außenkammern, die Hämoglobin-KCl-Lösung in die Mittelkammer eingefüllt. Die Konzentration der verwendeten Titrationslösungen betrug 0.07 bis 0.15 Mol KCl / kg Wasser. Um Konzentrationsfehler zu vermeiden, wurden beim Wechseln der Titrationslösungen die Außenkammern jeweils mit der nächst folgenden Titrationslösung zuerst ausgespült. Im Laufe einer Titrationsfolge konnte die Hämoglobin-KCl-Lösung der Mittelkammer je nach verfügbarer Präparatmenge zwei- bis fünfmal gewechselt werden.

Die Agar-KCl-Elektroden befanden sich zum Abgreifen der Spannungsdifferenz der Zelle in den beiden seitlich angebrachten Kaminen (siehe Abb. 6) .

Nach dem Einfüllen der Lösungen wurden die drei Einfüllstutzen verschlossen, Stickstoffzufuhr, Rührwerk und Meßapparatur eingeschaltet und der Abschirmkäfig geschlossen. Die EMK wurde bis zum Erreichen eines konstanten Wertes mit dem Schreiber (siehe Seite 40) registriert. Die Einstellzeit pro Meßpunkt betrug durchschnittlich zwei bis fünf Minuten.

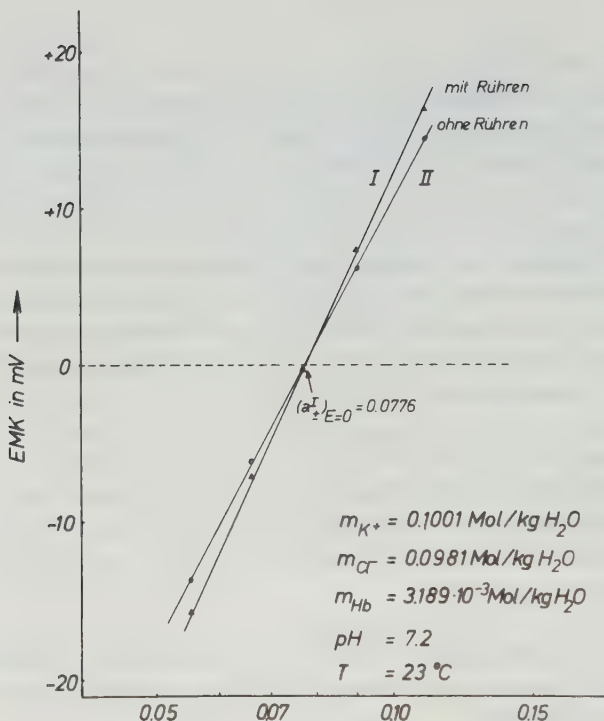
Die an den Elektroden und Salzbrücken auftretenden Asymmetriespannungen lagen in einem Bereich von etwa 0.3 mV; sie wurden eliminiert, indem die EMK je Meßpunkt unter Vertauschung der beiden Agar-KCl-Salzbrücken zweimal abgelesen und der Mittelwert der Absolutbeträge bei der Messungen verwendet wurde.

Nach Gl. (16) hängt die gemessene EMK direkt von der Temperatur ab; außerdem geht in die EMK-Werte die Temperaturabhängigkeit der mittleren Überföhrungszahlen und der mittleren Aktivitäten ein.

Bei der Nulltitration zur Bestimmung der Aktivitätskoeffizienten bleibt jedoch lediglich die relativ schwache Temperaturabhängigkeit der Aktivitätskoeffizienten der Titrationslösungen erhalten. Die Messungen konnten daher ohne Thermostatisierung bei einer Raumtemperatur von $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$ durchgeführt werden.

Die Genauigkeit der Methode ließ sich an Hand einer Probetitration feststellen. Hierzu wurde die Aktivität einer bekannten KCl-Lösung bestimmt. Der Fehler der Messung lag unter 1%. Die Reproduzierbarkeit der Meßwerte lag bei ± 0.1 mV.

Als Beispiel für eine Aktivitätsbestimmung ist die "Nulltitration" für eine 17,04%-ige Hämoglobin-KCl-Lösung in Abb. 8 dargestellt.



Mittlere Aktivität von KCl in den Bezugslösungen $a_{\pm}^I$
(logarithmisch)

Abb. 8: Potentiometrische "Nulltitration" einer 17.04 %-igen Hämoglobin-KCl-Lösung:

Elektromotorische Kraft (EMK) der Meßzelle in Abhängigkeit vom dekadischen Logarithmus der mittleren Aktivität von KCl, $a_{\pm}^I$, in den Außenkammern (Titrationslösungen).

Kurve I (Δ) : Bei kräftigem Rühren in allen Kammern;

Kurve II (O) : Ohne Rühren.

Meßlösung : Hb-KCl-Lösung bei pH 7.15 ,
 $m_{Hb} = 3.189 \times 10^{-3} \text{ Mol pro kg H}_2\text{O}$,
 $m_{Cl^-} = 0.0981 \text{ Mol pro kg Wasser}$,
 $m_{K^+} = 0.1001 \text{ Mol pro kg Wasser}$.

Kationen-Austauschermembran NEPTON CR-61 ,
 Anionen-Austauschermembran NEPTON AR-111 .

Temperatur: ca. 23 °C .

Die gemessenen EMK-Werte sind in Abhängigkeit vom dekadischen Logarithmus der KCl-Aktivität $a_{\pm}^I$ in den Außenkammern dargestellt. Die gefundene, lineare Abhängigkeit der EMK von $\log a_{\pm}^I$ zeigt, daß die mittleren Ionenüberföhrungszahlen in den Membranen (siehe Ausdruck vor dem Logarithmus in Gl.(15)) im vorhandenen Konzentrationsbereich unabhängig von der mittleren KCl-Aktivität sind.

Aus dem Schnittpunkt der dargestellten Geraden mit der Linie $E=0$ läßt sich der gesuchte Wert für $(a_{\pm}^I)_{E=0}$ ermitteln.

Abb.8 zeigt zwei Kurven: Kurve I wurde unter ständigem Röhren der Lösungen in allen drei Kammern erhalten. Bei abgeschaltetem Röhrraggregat ergab sich Kurve II. In beiden Fällen verlief die Funktion $E=f(\log a_{\pm}^I)$ im Titrationsbereich linear. Der etwas flachere Verlauf von Kurve II läßt sich durch Diffusionspotentiale erklären, die in den Flüssigkeitsfilmen auf den Membranen entstehen [43]. Diese Flüssigkeitsfilme können durch kräftiges Röhren so weit reduziert werden, daß ihr Einfluß verschwindend klein wird. Diese Schlußfolgerung wird noch unterstützt durch die Tatsache, daß die Steigerung der Titrationsgeraden I gleich dem Wert bei Titration mit reiner KCl-Lösung in der Mittelkammer ist.

Der Schnittpunkt beider Kurven mit der Geraden $E=0$ ist derselbe und damit $(a_{\pm}^I)_{E=0}$ mit und ohne Röhren gleich. Dieser Befund läßt sich auch theoretisch begründen [43].

3. Ergebnisse und Diskussion

3.1 Berechnung des mittleren Aktivitätskoeffizienten

Die Beeinflussung des chemischen Potentials eines Salzes durch die Protein-Polyionen wird durch die Änderung des mittleren Aktivitätskoeffizienten des Salzes gegenüber dem Wert in einer reinen Salzlösung gleicher Konzentration beschrieben.

Mit Gl. (13) und Gl. (17) erhält man für den stöchiometrischen mittleren molalen Aktivitätskoeffizienten ^{*)} von KCl in der Hämoglobin-KCl-Lösung folgende Beziehung:

$$\gamma_{\pm}^{II} = \frac{a_{\pm}^{II}}{\sqrt{m_K^{II} \cdot m_{Cl}^{II}}} \quad (23)$$

wobei $a_{\pm}^{II}$ die mittlere Aktivität von KCl in der Hämoglobin-KCl-Lösung,

$\gamma_{\pm}^{II}$ der stöchiometrische mittlere molale Aktivitätskoeffizient von KCl in der Hämoglobin-KCl-Lösung und

m_K^{II}, m_{Cl}^{II} die Gesamtkonzentration an Kalium- bzw. Chloridionen in der Hämoglobin-KCl-Lösung in Mol pro kg Gesamtwasser ist.

*) Bei der Berechnung wurde die gemessene Gesamtkonzentration an Kalium- und Chloridionen in Mol pro kg Wasser eingesetzt.

Bei der Anwendung der "Nulltitration" (s.S. 42f) zur Bestimmung der mittleren KCl-Aktivität wird nach Gl.(18) :

$$\gamma_{\pm}^{\text{II}} = \frac{(a_{\pm}^{\text{I}})_{E=0}}{\sqrt{m_{\text{K}^+}^{\text{II}} \cdot m_{\text{Cl}^-}^{\text{II}}}} \quad . \quad *) \quad (24)$$

In Abb.9 (siehe Seite 48,s.a. Tabelle 3 , S. 55) sind die Ergebnisse für den stöchiometrischen mittleren molalen Aktivitätskoeffizienten von KCl in Hämoglobin-KCl-Lösungen aufgetragen über der molalen Hämoglobinkonzentration.

*) Im folgenden wird die Indizierung "II" der die Hämoglobin-KCl-Lösungen betreffenden Größen weggelassen, da sich alle diese Größen nur noch auf die Hämoglobin-KCl-Lösung beziehen.

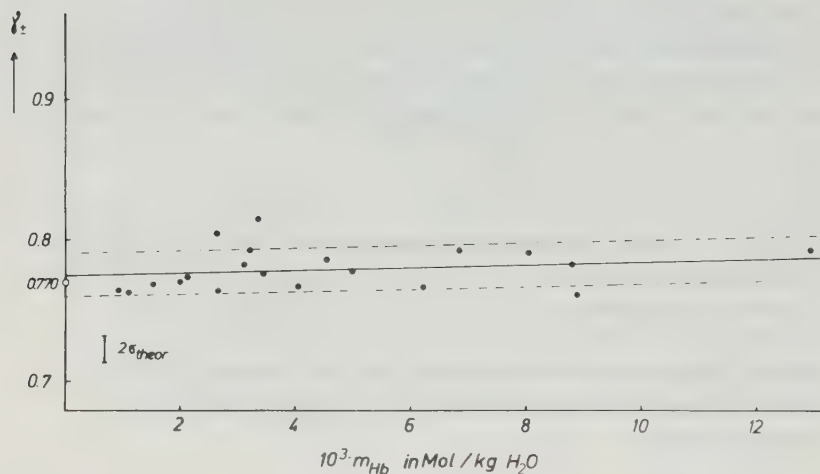


Abb. 9: Stöchiometrischer mittlerer molaler Aktivitätskoeffizient von KCl in Hämoglobin-KCl-Lösungen in Abhängigkeit von der Hämoglobin(Hb)-Konzentration in Mol pro kg Gesamtwasser:

----- : Ausgleichsgerade mit mittlerer Abweichung der Meßpunkte;

σ_{theor} : (max.) berechneter mittlerer Fehler der einzelnen Meßwerte (s.S. 73).

pH 7.15 ; Temperatur : ca. 23°C .

Durch die Meßpunkte ist eine Ausgleichsgerade berechnet worden. Der stöchiometrische mittlere molale Aktivitätskoeffizient steigt mit wachsender Proteinkonzentration geringfügig an. Man würde jedoch mit zunehmender Hämoglobinkonzentration eine wachsende Beeinflussung der kleinen Ionen von seiten der Makromoleküle erwarten. ("Beeinflussung" sei hier als Bindung von Ionen am Hämoglobinmolekül im weitesten Sinne verstanden).

Eine stärkere Beeinflussung müßte eine Abnahme des Aktivitätskoeffizienten zur Folge haben. Mit steigender Hämoglobinkonzentration müßte diese Beeinflussung größer werden. Betrachtet man dagegen den Kurvenverlauf in Abb. 9, so muß eine eher noch geringere Wechselwirkung der kleinen Ionen untereinander und mit den Hämoglobinmolekülen angenommen werden als in einer reinen KCl-Lösung gleicher Konzentration.

Nun ist der im Experiment gemessene stöchiometrische mittlere molale Aktivitätskoeffizient ein Ausdruck, der alle Einflüsse der Proteinpolyionen auf die K^+ - und Cl^- -Ionen implizit enthält, sowie alle Wechselwirkungen der kleinen Ionen untereinander.

Für die Beeinflussung des Aktivitätskoeffizienten des Salzes durch die Hämoglobin-Polyionen sind hier folgende drei Mechanismen vorstellbar:

Die Wechselwirkung der Hämoglobinmoleküle mit den Wassermolekülen, die Wirkung ihres elektrostatischen Feldes auf die Kalium- und Chloridionen und die spezifische chemische Bindung von Ionen am Hämoglobinmolekül.

Obwohl diese drei Mechanismen nicht unabhängig voneinander sind, sollen sie der Einfachheit halber als voneinander

unabhängig angenommen werden, so daß eine Aufspaltung des gemessenen stöchiometrischen Aktivitätskoeffizienten in drei Faktoren möglich wird [43] :

$$\gamma_{\pm} = (\gamma_{\pm})_w \cdot (\gamma_{\pm})_{el} \cdot (\gamma_{\pm})_v \quad .$$

(25)

Die verwendeten Indizes: w, el, v bezeichnen jeweils den Anteil am Aktivitätskoeffizienten, der durch die Wechselwirkung der Hämoglobinmoleküle mit Wasser (w), durch den Einfluß des elektrostatischen Feldes der Ladungen auf den Hämoglobinmolekülen auf die kleinen Ionen und die elektrostatischen Wechselwirkungen der kleinen Ionen untereinander (el) bzw. durch die spezifische Bindung von Ionen am Protein (v) bedingt ist.

Um über Gl. (25) aus dem gemessenen stöchiometrischen Aktivitätskoeffizienten (siehe Abb.9) den Anteil zu erhalten, der nur den direkten Einfluß der Hämoglobin-Polyionen auf die Salzionen durch das elektrostatische Feld und / oder eine spezifische Bindung von K^+ -oder Cl^- -Ionen enthält - also das Produkt $(\gamma_{\pm})_{el} \cdot (\gamma_{\pm})_v$ - muß man $(\gamma_{\pm})_w$ aus unabhängigen Messungen kennen.

3.2 Berücksichtigung der Protein-Wasser-Wechselwirkungen

Proteinmoleküle sind Polyionen mit positiven und negativen Ladungsgruppen sowie Gruppen mit Dipolcharakter, die alle mit den Wasserdipolen wechselwirken; es kommt zu einer Änderung der Wasserstruktur in ihrer Umgebung. Die Menge des dadurch beeinflussten Wassers, das hier auch als "gebundenes Wasser" bezeichnet werden soll, läßt sich nach verschiedenen Methoden bestimmen. Im allgemeinen erhält man für Proteine etwa 0.2-0.5 Gramm "gebundenes Wasser" pro Gramm trockenes Protein [1,3,5,6,13,23,34,49]. In der vorliegenden Arbeit wurde ein Wert von 0.3 Gramm "gebundenes Wasser" pro Gramm trockenes Protein angenommen.

Diesem Wert entspricht ein Wassermantel um das kugelförmig gedachte Hämoglobinmolekül von ein bis zwei Molekülschichten.

Im folgenden wird davon ausgegangen, daß das gebundene Wasser den kleinen Ionen als Lösungsraum verlorengeht [1,14,15,19]. Das "proteineigene" Wasser, auch als "non-solvent-water" bezeichnet, soll weder Kalium- noch Chloridionen enthalten. Im verbliebenen Lösungsraum kommt es folglich zu einem Anstieg der Ionenkonzentration.

Die stöchiometrische Ionenkonzentration muß nun umgerechnet werden in Ionenkonzentrationen pro kg "freies" Wasser über die Beziehung:

$$\frac{(m_1)_w}{m_1} = \frac{1}{(1 - \eta_{Hb}^m)}, \quad (26)$$

wobei m_i	die Ionenkonzentration in Mol pro kg Gesamtwasser,
$(m_i)_w$	die Ionenkonzentration in Mol pro kg "freies" Wasser,
η	die mittlere Menge "gebundenes Wasser" in kg pro Mol Hämoglobin und
m_{Hb}	die Hämoglobinkonzentration in Mol pro kg Wasser ist.

Durch Einsetzen von Gl. (26) in Gl. (24) erhält man:

$$\gamma_{\pm}^{\pm} = \frac{(a_{\pm}^{\pm})_{E=0}}{\sqrt{(m_{K^+})_w \cdot (m_{Cl^-})_w}} \cdot \frac{1}{(1 - \eta m_{Hb})} \quad (27)$$

Der Vergleich mit Gl. (25) liefert unter der Annahme,
daß $(\gamma_{\pm}^{\pm})_p = 1$ ist:

$$(\gamma_{\pm}^{\pm})_w = \frac{1}{(1 - \eta m_{Hb})} \quad (28)$$

Mit $(\gamma_{\pm})_w$ aus Gl. (28) erhält man ebenfalls aus Gl. (25):

$$\frac{\gamma_{\pm}}{(\gamma_{\pm})_w} \equiv \gamma_{\pm} (1 - \eta_{\text{mHb}}) = (\gamma_{\pm})_{e1} \cdot (\gamma_{\pm})_v \equiv \gamma_{\pm}^* \quad .$$

(29)

Die für den Einfluß des gebundenen Wassers korrigierten mittleren Aktivitätskoeffizienten $\gamma_{\pm}^*$ (siehe Gl. (29) und Tabelle 3 und 4, Seite 55, 65) sind in Abb. 10 über der Hämoglobin-Molalität aufgetragen. Durch die Meßpunkte ist eine Ausgleichsgerade gelegt.

Tabelle 2

Zusammensetzung der Meßlösungen

Lös.- Nr.	Gew.-% Hb	$m_{\text{Hb}} \cdot 10^3$	m_{K^+}	m_{Cl^-}
1	5.71	0.939	0.1029	0.0991
2	6.76	1.126	0.1009	0.1019
3	8.97	1.530	0.1022	0.1010
4	11.37	1.992	0.1024	0.0983
5	12.04	2.126	0.1016	0.1019
6	14.63	2.662	0.1007	0.0998
7	14.68	2.672	0.1006	0.1042
8	17.04	3.189	0.1001	0.0981
9	17.19	3.223	0.1007	0.1046
10	17.81	3.365	0.1046	0.0988
11	18.20	3.455	0.1016	0.1043
12	20.68	4.048	0.0993	0.1068
13	22.73	4.568	0.1001	0.0983
14	24.35	4.998	0.1025	0.1061
15	28.60	6.220	0.0979	0.1120
16	30.60	6.850	0.1010	0.1082
17	34.12	8.042	0.0997	0.0995
18	36.14	8.788	0.1001	0.1137
19	36.48	8.918	0.0972	0.1165
20	45.47	12.950	0.0960	0.1189

Tabelle 3

Mittlere molale Aktivitätskoeffizienten nach Berücksichtigung des "non-solvent"-Wassers.

Lös.- Nr.	$m_{\text{Hb}} \cdot 10^3$	$(a_{\pm}^{\text{I}})_{E=0}$	$\gamma_{\pm}$	$\frac{1}{(\gamma_{\pm})_w}$	$\gamma_{\pm}^* = \frac{\gamma_{\pm}}{(\gamma_{\pm})_w}$
1	0.939	0.0772	0.7650	0.9829	0.7519
2	1.126	0.0774	0.7628	0.9782	0.7462
3	1.530	0.0781	0.7687	0.9704	0.7460
4	1.992	0.0773	0.7707	0.9615	0.7410
5	2.126	0.0787	0.7733	0.9589	0.7415
6	2.662	0.0807	0.8046	0.9486	0.7632
7	2.672	0.0782	0.7637	0.9484	0.7243
8	3.189	0.0776	0.7834	0.9384	0.7351
9	3.223	0.0814	0.7935	0.9377	0.7441
10	3.365	0.0829	0.8157	0.9350	0.7627
11	3.455	0.0799	0.7761	0.9333	0.7243
12	4.048	0.0790	0.7673	0.9218	0.7073
13	4.568	0.0779	0.7855	0.9118	0.7162
14	4.998	0.0812	0.7786	0.9034	0.7034
15	6.220	0.0803	0.7670	0.8798	0.6748
16	6.850	0.0828	0.7925	0.8677	0.6875
17	8.042	0.0788	0.7913	0.8446	0.6684
18	8.788	0.0835	0.7826	0.8302	0.6497
19	8.918	0.0810	0.7614	0.8277	0.6302
20	12.950	0.0846	0.7924	0.7498	0.5942

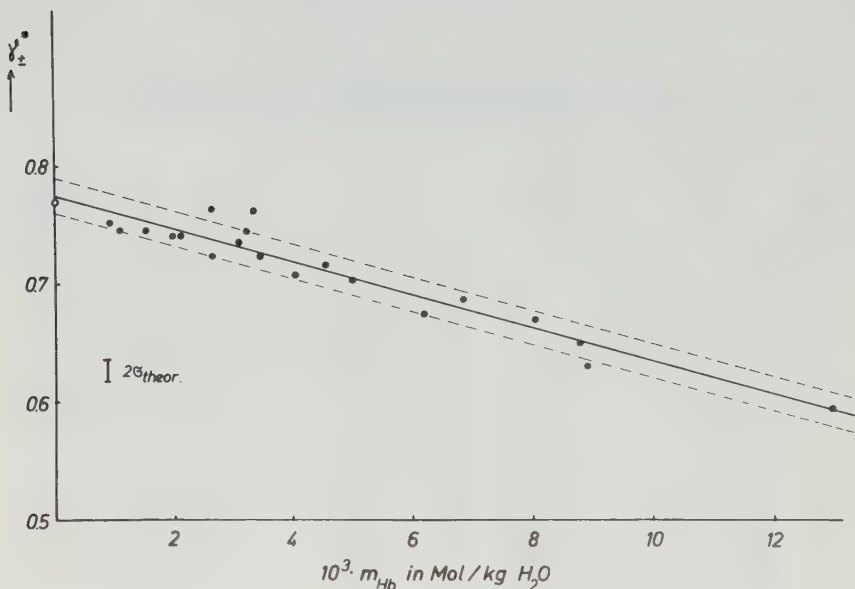


Abb. 10: Mittlerer molaler Aktivitätskoeffizient nach Berücksichtigung von 0.3 g "non-solvent"-Wasser pro Gramm Hämoglobin in Abhängigkeit von der Hämoglobinkonzentration in Mol pro kg Wasser.

----- : Ausgleichsgerade mit mittlerer Abweichung der Meßwerte;

$\gamma_{\pm}^{theor.}$: (max.) berechneter mittlerer Fehler der einzelnen Meßwerte (siehe S. 72).

KCl-Konzentration: 0.1 Mol KCl pro kg Wasser;
pH 7.15 ; Temperatur : ca. 23°C.

$\gamma_{\pm}^* = \frac{\gamma_{\pm}^+}{(\gamma_{\pm}^+)_w}$ ist ein Maß für die "direkte" Wirkung der

Hämoglobinmoleküle auf die Kalium- und Chloridionen durch das elektrostatische Feld des Proteinmoleküls und/oder eine spezifische Bindung von Ionen am Hämoglobinmolekül.

Eine getrennte Bestimmung von $(\gamma_{\pm}^+)_e$ und $(\gamma_{\pm}^+)_v$ aus den Meßergebnissen ist nicht möglich. Man kann jedoch durch Annahmen über eine der beiden Größen die andere jeweils aus den Meßwerten bestimmen.

3.3 Deutung der Ergebnisse als elektrostatische Aktivitätskoeffizienten

Es soll nun versucht werden, die Abnahme des stöchiometrischen mittleren molalen Aktivitätskoeffizienten, nach Korrektur für "non-solvent-water", allein durch elektrostatische Wechselwirkungen zwischen den Hämoglobin-Polyionen und den kleinen Ionen zu deuten. Dazu muß $(\gamma_{\pm})_v$ aus unabhängigen Messungen bekannt sein. Hier wird zunächst angenommen, daß keine spezifische Bindung von Kalium- oder Chloridionen am Hämoglobinmolekül bei pH-Werten in der Umgebung des isoelektrischen Punktes vorliegt; demzufolge wird $(\gamma_{\pm})_v$ gleich Eins gesetzt.

Damit folgt aus Gl. (29):

$$\gamma_{\pm}^* = \frac{\gamma_{\pm}}{(\gamma_{\pm})_w} = (\gamma_{\pm})_{e1} \quad .$$

(30)

Auf Grund dieser Deutung der Ergebnisse nimmt der elektrostatische mittlere Aktivitätskoeffizient in der Hämoglobin-KCl-Lösung mit steigender Hämoglobinkonzentration um max. 20% (in 45%-iger Hb-Lösung) gegenüber 0.1 molaler, reiner KCl-Lösung ab (s. Abb.9). Diese Erniedrigung des elektrostatischen mittleren Aktivitätskoeffizienten entspricht einer reinen KCl-Lösung mit einer Konzentration von etwa 1.3 Mol KCl pro kg Wasser (s. Tabellenwerte [11]).

Durch das "non-solvent"-Wasser wird die molale Konzentration von KCl jedoch auf höchstens 0.13 Mol pro kg "freies" Wasser erhöht.

Die Konzentrationserhöhung auf 0.13 Mol KCl pro kg "freies" Wasser hat eine Erniedrigung des Aktivitätskoeffizienten von max. 3% zur Folge ^{*)}, was im folgenden vernachlässigt werden soll.

Die geringfügige Konzentrationserhöhung von KCl durch die Wasserbindung und die dadurch bedingte Erhöhung der elektrostatischen Wechselwirkungen der kleinen Ionen untereinander scheidet also zur Erklärung der Ergebnisse für $(\delta_{\pm})_{el}$ aus. Nach obigem Ergebnis muß ein direkter elektrostatischer Einfluß der Hämoglobinmoleküle auf die kleinen Ionen erwogen werden.

Bei dem gemessenen pH von 7.15, also in der Nähe des isoelektrischen Punktes für Hämoglobin, ist die Bilanzladung des Hämoglobinmoleküls praktisch gleich Null. Die relativ starke Beeinflussung durch ein elektrisches Monopolfeld ist somit ausgeschlossen.

Wenn man davon ausgeht, daß die insgesamt etwa 100 positiven und 100 negativen Ladungsgruppen des Hämoglobinmoleküls am isoelektrischen Punkt gleichmäßig ^{**)} über die gesamte Oberfläche des Proteinmoleküls verteilt sind, kann von ihnen keine wesentliche elektrostatische Einwirkung auf die kleinen Ionen mehr ausgehen, d.h. ihr elektrostatisches Multipolfeld fällt mit dem Abstand vom Hämoglobinmolekül sehr steil ab. Eine ausreichende elektrostatische Feldstärke über die Wasserhülle des Hämoglobinmoleküls hinaus ist schwer vorstellbar.

^{*)} Bezogen auf den Wert 0.770 für $\delta_{\pm}$, entsprechend einer 0.1 m KCl-Lösung bei 25 °C.

^{**) Aus Messungen des elektrostatischen Dipolmomentes des Hb-Moleküls am isoelektrischen Punkt [35] läßt sich zeigen, daß nur zwei Prozent der hier insgesamt etwa 200 positiven und negativen Ladungen an der Oberfläche des Moleküls zum Dipolmoment beitragen, was bedeutet, daß nahezu alle positiven und negativen Ladungsgruppen als gleichmäßig über die Oberfläche des Moleküls verteilt angenommen werden dürfen.}

Versuchsweise kann man sich die Ladungsgruppen des Protein-Polyions isoliert denken und gleichsam als freie in Lösung befindliche Ionen annehmen, wobei eine regelmäßige Verteilung angenommen wird, die sich in die Struktur der Umgebungslösung einfügt. Bei einem pH von 7.15 trägt jedes Hämoglobinmolekül etwa 100 positive und 100 negative Ladungen (s. S. 59). Zählt man also die Ladungsgruppen der Hämoglobinmoleküle als einwertige Ionen, so ergibt sich eine Gesamtionenstärke der Lösung von max. 1.3 Mol pro kg Wasser bei einer maximalen Hämoglobinkonzentration von ca. 13×10^{-3} Mol pro kg Wasser (ca. 45%).

Bei dieser Ionenstärke stimmt der aus Tabellen entnommene Aktivitätskoeffizient von 0.586 überraschend gut mit dem experimentell gefundenen Wert von 0.594 überein.

Um dieses Modell zu überprüfen, wurde der mittlere Abstand zweier benachbarter positiver oder negativer Ladungsgruppen auf der kugelförmig angenommenen Hämoglobinoberfläche berechnet; er beträgt etwa $10 \overset{0}{\text{\AA}}$.

Bei einem mittleren Abstand zweier benachbarter Kalium- bzw. Chloridionen in der 0.1 molalen KCl-Lösung von 25 Å, läßt sich das angenommene Modell nicht ohne Störung der Ionenverteilung in die Struktur der 0.1 molalen KCl-Lösung einfügen.

3.4 Deutung der Ergebnisse als spezifische Bindung von Ionen am Hämoglobinmolekül

Nachdem ein Einfluß des elektrostatischen Feldes zur Erklärung des veränderten Aktivitätskoeffizienten nicht auszureichen scheint, soll nun der gesamte Einfluß der Hämoglobinmoleküle auf den Aktivitätskoeffizienten von KCl der spezifischen Bindung von Ionen am Hämoglobinmolekül allein zugeschrieben werden.

Aus der Literatur ist bekannt, daß die Bindung einwertiger Kationen an Proteine in der Nähe des isoelektrischen Punktes so gut wie ausgeschlossen ist. Hingegen wird die Bindung einwertiger Anionen mehrfach beschrieben [53], obwohl eine auffällige Bindung von Cl^- -Ionen an Hämoglobinmoleküle am isoelektrischen Punkt bisher nicht beobachtet wurde [2,10] .

Entgegen der Annahme zu Beginn von Abschnitt 3.3 (s.S. 58) wird jetzt ein Einfluß elektrostatischer Natur von seiten der Hämoglobin-Polyionen ausgeschlossen, so daß $(\gamma_{\pm}^+)^{\text{el}}$ gleich dem mittleren Aktivitätskoeffizienten $\gamma_{\pm}^{(0)}$ in einer reinen KCl-Lösung gleicher Molalität gesetzt werden kann. Nach Gl. (29) ergibt sich dann:

$$\gamma_{\pm}^* = \frac{\gamma_{\pm}^+}{(\gamma_{\pm}^+)_w} = \gamma_{\pm}^{(0)} \cdot (\gamma_{\pm}^+)_p \quad . \quad (31)$$

Aus $(\gamma_{\pm})_v$ läßt sich die Zahl der spezifisch gebundenen Chloridionen ν_{Cl^-} , wie folgt ermitteln: Die durch die angenommene Bindung bedingte Änderung der molalen Chloridkonzentration ergibt sich zu:

$$(m_{Cl^-})_{fr} = (m_{Cl^-})_w - \nu_{Cl^-} \cdot (m_{Hb})_w \quad ,$$

(32)

wobei $(m_{Cl^-})_{fr}$ die freie Chloridkonzentration in Mol pro kg "freies" Wasser,
 $(m_{Cl^-})_w$ die stöchiometrische Chloridkonzentration in Mol pro kg "freies" Wasser,
 ν_{Cl^-} die Anzahl der gebundenen Chloridionen pro Hämoglobinmolekül und
 $(m_{Hb})_w$ die Hämoglobinkonzentration in Mol pro kg "freies" Wasser ist.

Hierbei wird angenommen, daß ν_{Cl^-} nicht von der Hämoglobinkonzentration abhängt.

Aus Gl. (32) ergibt sich:

$$(m_{Cl^-})_w = (m_{Cl^-})_{fr} \cdot \frac{1}{\left(1 - \nu_{Cl^-} \cdot \frac{(m_{Hb})_w}{(m_{Cl^-})_w}\right)} \quad .$$

(33)

Durch Einsetzen von Gl. (33) in Gl. (27) erhält man:

$$\gamma_{\pm}^* = \frac{(a_{\pm})_{E=0}}{\sqrt{(m_{Cl^-})_{fr} \cdot (m_{K^+})_{fr}}} \cdot \sqrt{1 - \gamma_{Cl^-} \cdot \frac{(m_{Hb})_w}{(m_{Cl^-})_w}} \cdot \frac{1}{(1 - \gamma_{Hb})} \quad .$$

(34)

Dabei wurde angenommen, daß keine Kaliumionen an Hämoglobinmoleküle gebunden werden; daher gilt: $(m_{K^+})_w = (m_{K^+})_{fr}$. Der erste Term in Gl. (34) entspricht dem elektrostatischen Aktivitätskoeffizienten $(\gamma_{\pm})_{el}$. Nach Gl. (28) stellt der letzte Term $(\gamma_{\pm})_w$ dar.

Für $(\gamma_{\pm})_v$ erhält man also:

$$(\gamma_{\pm})_v = \sqrt{1 - \gamma_{Cl^-} \cdot \frac{(m_{Hb})_w}{(m_{Cl^-})_w}} = \sqrt{1 - \gamma_{Cl^-} \cdot \frac{m_{Hb}}{m_{Cl^-}}}$$

(35)

und nach Einsetzen in Gl. (31):

$$\gamma_{\pm}^* = \frac{\gamma_{\pm}}{(\gamma_{\pm})_w} = \gamma_{\pm}^{(o)} \cdot \sqrt{1 - \gamma_{Cl^-} \cdot \frac{m_{Hb}}{m_{Cl^-}}} \quad .$$

(36)

Die in Abb. 10 dargestellten Ergebnisse für $\gamma_{\pm}^*$ können somit nach dieser Interpretation mit Gl.(36) zur Bestimmung der im Mittel pro Hämoglobinmolekül gebundenen Chloridionen verwendet werden; hierzu wird Gl.(36) umgeformt in:

$$\left(\frac{\gamma_{\pm}^*}{\gamma_{\pm}^{(o)}} \right)^2 = 1 - \nu_{\text{Cl}^-} \cdot \left(\frac{m_{\text{Hb}}}{m_{\text{Cl}^-}} \right) \quad (37)$$

Für $\gamma_{\pm}^{(o)}$ wurde - entsprechend der KCl-Konzentration von 0.1 Mol pro kg Wasser - der Wert 0.770 eingesetzt [11] .

Abb.11 (siehe Seite 66) zeigt $\left(\frac{\gamma_{\pm}^*}{\gamma_{\pm}^{(o)}} \right)^2$ in Abhängigkeit von $\left(\frac{m_{\text{Hb}}}{m_{\text{Cl}^-}} \right)$; (s.a. Tabelle 4, Seite 65).

Tabelle 4

Zur Bestimmung der im Mittel pro Hämoglobin-Molekül gebundenen Chloridionen.

Lös.- Nr.	$m_{\text{Hb}} \cdot 10^3$	m_{Cl^-}	$\frac{m_{\text{Hb}}}{m_{\text{Cl}^-}}$	$(\frac{\gamma_{\pm}^*}{\gamma_{\pm}^{(0)}})^2$
1	0.939	0.0991	0.0095	0.9535
2	1.126	0.1019	0.0110	0.9391
3	1.530	0.1010	0.0101	0.9386
4	1.992	0.0983	0.0203	0.9261
5	2.126	0.1019	0.0208	0.9271
6	2.662	0.0998	0.0267	0.9824
7	2.672	0.1042	0.0256	0.8848
8	3.189	0.0981	0.0325	0.9114
9	3.223	0.1046	0.0308	0.9339
10	3.365	0.0988	0.0341	0.9811
11	3.455	0.1043	0.0331	0.8848
12	4.048	0.1068	0.0379	0.8438
13	4.568	0.0983	0.0465	0.8651
14	4.998	0.1061	0.0472	0.8345
15	6.220	0.1120	0.0555	0.7680
16	6.850	0.1082	0.0633	0.7972
17	8.042	0.0995	0.0808	0.7535
18	8.788	0.1137	0.0773	0.7119
19	8.918	0.1165	0.0765	0.6698
20	12.950	0.1189	0.1089	0.5955

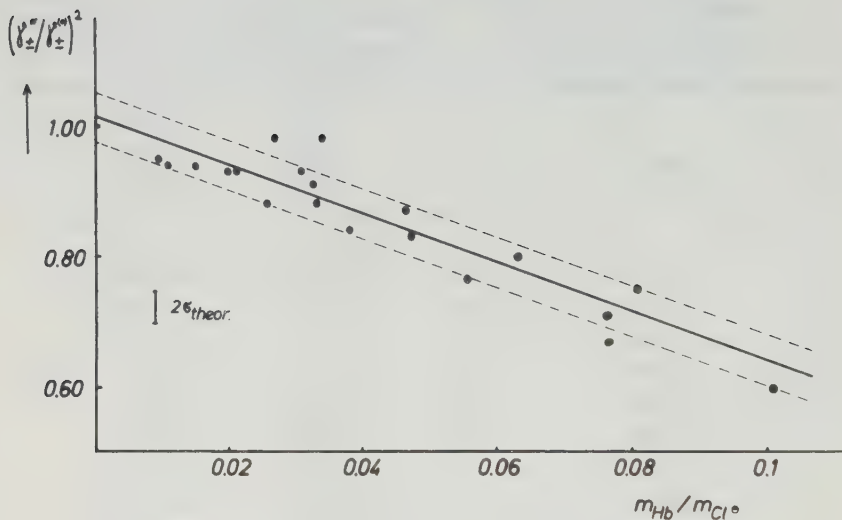


Abb. 11: Zur Bestimmung der im Mittel pro Hämoglobin-Molekül gebundenen Chloridionen (siehe Gl.(37)): Quadrat der relativen mittleren molalen Aktivitätskoeffizienten von KCl in Hb-KCl-Lösungen bezogen auf den Wert in einer reinen KCl-Lösung gleicher Molalität, nach Berücksichtigung des "non-solvent"-Wassers, in Abhängigkeit vom Verhältnis der Hb-Molalität zur Cl^- -Molalität.

• : Ergebnisse aus Abb.10 nach Umrechnung;

$$\gamma_{\pm}^{(0)} = 0.770 .$$

---: Ausgleichsgerade mit mittlerer Abweichung der Meßwerte .

Innerhalb der Fehlergrenze der Methode ergibt sich die in Gl. (37) geforderte lineare Abhängigkeit.

Die dargestellte Ausgleichsgerade wird durch die Gleichung beschrieben:

$$\left(\frac{\delta_{\pm}^*}{\delta_{\pm}^{(0)}} \right)^2 = (1.01 \pm 0.02) - (3.75 \pm 0.33) \cdot \frac{m_{\text{Hb}}}{m_{\text{Cl}^-}} \quad (38)$$

Für die Zahl der im Mittel am Hämoglobinmolekül gebundenen Chloridionen erhält man somit:

$$\nu_{\text{Cl}^-} = 3.75 \pm 0.33 \quad (39)$$

Es zeigt sich also, daß die Abnahme des mittleren Aktivitätskoeffizienten nach Berücksichtigung des "non-solvent"-Wassers durch die spezifische Bindung von etwa vier Chloridionen pro Hämoglobinmolekül erklärt werden kann. In der Literatur ist eine Bindung von Chloridionen an Hämoglobin jedoch bisher nicht beschrieben worden. CARR [9,10] hat mit Hilfe von Aktivitätsmessungen die Bindung von kleinen Ionen an Hämoglobin (Mensch, Rind) in der Umgebung des isoelektrischen Punktes untersucht. Es gab keine Anzeichen

für eine signifikante Bindung zwischen Hämoglobin und Chlorid- bzw. Kaliumionen. MORRIS und WRIGHT [33] kommen zum gleichen Ergebnis. Es muß jedoch erwähnt werden, daß hier mit relativ geringen Hämoglobinkonzentrationen gearbeitet wurde - im äußersten Fall 4.3 Gew.-% Hämoglobin (entsprechend 0.7×10^{-3} Mol Hämoglobin pro kg Wasser) bei einem KCl-Konzentrationsbereich von etwa 0.01 bis 0.1 Mol pro kg Wasser.

Es kann nicht ausgeschlossen werden, daß bei den zitierten Arbeiten die Meßgenauigkeit nicht ausreichte, um bei diesen niedrigen Hämoglobinkonzentrationen auf eine signifikante Chlorid-Bindung schließen zu können. Hinzu kommt die Meßunsicherheit durch die Diffusionspotentiale an den Salzbrücken bei diesen Messungen: Die Autoren verwendeten, im Gegensatz zur vorliegenden Methode, eine ionenselektive Elektrode in Verbindung mit einer Referenzelektrode mit Salzbrücke. Wie sich auf Grund prinzipieller thermodynamischer Überlegungen zeigen läßt [36,46], kann man mit einer solchen Meßanordnung die Bindung von Ionen an Proteinmoleküle prinzipiell nicht exakt bestimmen.

3.5 Vergleich der Ergebnisse mit Literaturwerten

Die stöchiometrischen mittleren molalen Aktivitätskoeffizienten von KCl in hochkonzentrierten Hämoglobinslösungen sind bisher nicht gemessen worden. Es lassen sich jedoch Vergleiche mit ähnlichen Messungen an anderen Proteinen anstellen.

PFISTER [43,47] hat die stöchiometrischen mittleren molalen Aktivitätskoeffizienten von 0.1 Mol KCl in konzentrierten Rinderserumalbuminlösungen (RSA bis ca. 20 Gew.-%) bei verschiedenen pH-Werten mit Membranelektroden gemessen und zwar nach der gleichen Methode, wie sie in dieser Arbeit beschrieben wird. Der stöchiometrische mittlere molale Aktivitätskoeffizient nahm dabei im untersuchten pH-Bereich von 4.2-9.8, entsprechend dem Bereich der Bilanzladung der Rinderserumalbuminmoleküle von +11 bis -33, mit der RSA-Konzentration ab; diese Erniedrigung von $\gamma_{\pm}$ betrug jedoch maximal nur etwa 15 Prozent gegenüber dem Wert in einer 0.1 molalen KCl-Lösung.

Durch Berücksichtigung der spezifischen Bindung von Chloridionen am RSA-Molekül und des "non-solvent"-Wassers wurden die mittleren "elektrostatischen" Aktivitätskoeffizienten $\gamma_{\pm}^*$ bestimmt (vergl. Gl. (34), Seite 63 der vorliegenden Arbeit). Diese nahmen mit steigendem Absolutwert der Bilanzladung der RSA-Konzentration maximal um 10 % (bei pH 9.8 und 18 Gew.-% RSA) gegenüber dem Wert in einer reinen 0.1 molalen KCl-Lösung ab. Die Extrapolation der Ergebnisse auf die Bilanzladung Null - entsprechend dem isoelektrischen Punkt - ergibt einen mittleren "elektrostatischen" Aktivitätskoeffizienten, der innerhalb der Fehlergrenzen der Methode mit dem Wert einer reinen 0.1 molalen KCl-Lösung übereinstimmt.

Diese Ergebnisse stützen somit die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Überlegungen (s. Abschn. 3.3 und 3.4), daß die gefundene Erniedrigung des stöchiometrischen mittleren Aktivitätskoeffizienten von KCl in den Hämoglobin-KCl-Lösungen bei einem pH-Wert in der Nähe des isoelektrischen Punktes durch eine spezifische Bindung von Cl^- -Ionen und/oder K^+ -Ionen am Hämoglobinmolekül zu erklären ist.

4. Fehlerberechnung

Aus den Fehlern der einzelnen Meßproben läßt sich der Gesamtfehler der nach Gl. (24) berechneten mittleren Aktivitätskoeffizienten bestimmen.

Für den absoluten mittleren Fehler gilt allgemein:

$$\begin{aligned} \sigma \gamma_{\pm}^* &= \pm \left[\left(\frac{\sigma \gamma_{\pm}^*}{(a_{\pm}^I)_{E=0}} \right)^2 \cdot (\sigma (a_{\pm}^I)_{E=0})^2 \right. \\ &\quad + \left(\frac{\sigma \gamma_{\pm}}{\sigma_F} \right)^2 \cdot (\sigma_F)^2 \\ &\quad + \left(\frac{\sigma \gamma_{\pm}}{\sigma_{m_{K^+}}} \right)^2 \cdot (\sigma_{m_{K^+}})^2 \\ &\quad \left. + \left(\frac{\sigma \gamma_{\pm}^*}{\sigma_{m_{Cl^-}}} \right)^2 \cdot (\sigma_{m_{Cl^-}})^2 \right]^{\frac{1}{2}}. \quad (40) \end{aligned}$$

Die Größe F steht dabei für $(\gamma_{\pm})_w^{-1} = (1 - \eta_{Hb})$;
(s. Gl. (28), S.52).

Für den relativen mittleren Fehler erhält man aus der Bestimmungsgleichung:

$$\begin{aligned} \frac{\sigma \gamma_{\pm}^*}{\gamma_{\pm}^*} &= \pm \left[\left(\frac{\sigma (a^I)_{E=0}}{(a^I)_{E=0}} \right)^2 + \frac{1}{4} \left(\frac{\sigma_{m_{K^+}}}{m_{K^+}} \right)^2 \right. \\ &\quad + \frac{1}{4} \left(\frac{\sigma_{m_{Cl^-}}}{m_{Cl^-}} \right)^2 \\ &\quad \left. + \left(\frac{1-F}{F} \right)^2 \cdot \left(\frac{\sigma_{m_{Hb}}}{m_{Hb}} \right)^2 \right]^{\frac{1}{2}}. \quad (41) \end{aligned}$$

Die Einzelfehler, die sich aus der Reproduzierbarkeit der Messungen ergaben, betrugen :

Für die mittlere Aktivität (s.S. 42)

$$\frac{\delta (a^I)_{E=0}}{(a^I)_{E=0}} = \pm 0.01 ,$$

für die Kaliumkonzentration (s.S. 28)

$$\frac{\delta m_{K^+}}{m_{K^+}} = \pm 0.01 ,$$

für die Chloridkonzentration (s.S. 24)

$$\frac{\delta m_{Cl^-}}{m_{Cl^-}} = \pm 0.01 ,$$

und für die Hämoglobinkonzentration (s.S. 19)

$$\frac{\delta m_{Hb}}{m_{Hb}} = \pm 0.005 .$$

Nach Einsetzen in Gleichung Gl.(41) erhält man schließlich für den relativen mittleren Fehler:

$$\frac{\delta \gamma_{\pm}^*}{\gamma_{\pm}^*} = \pm 0.0122 ,$$

wobei das letzte Glied in der Klammer von Gl.(42) selbst bei den niedrigsten vorkommenden Werten für F vernachlässigt werden konnte.

Die mittlere Abweichung der Meßpunkte von der Ausgleichsgeraden in Abb. 9 (s. S. 48) beträgt absolut ± 0.014 ; das bedeutet eine relative mittlere Abweichung von $\pm 1.8\%$ bis $\pm 2.3\%$.

Die Fehlerabschätzung zeigt somit, daß die mittleren Aktivitätskoeffizienten von KCl in der Hämoglobin-KCl-Lösung unter Berücksichtigung der Fehlergrenze der Methode in guter Näherung linear von der Hämoglobin-Molalität abhängen.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde der mittlere Aktivitätskoeffizient von KCl in Hämoglobin-KCl-Lösungen bestimmt. Die Ergebnisse sollten einen Beitrag zum besseren Verständnis des Zustandes der kleinen Ionen im Zytoplasma liefern.

Die relativ einfache und gut bekannte Zusammensetzung des Zytoplasmas des Erythrozyten diente als Vorlage für die verwendeten Lösungen: die KCl-Konzentration betrug 0.1 Mol/kg Wasser, die Hämoglobinkonzentration bis zu 45 Gew.-%. Nach Berücksichtigung von 0.3 g "non-solvent"-Wasser pro Gramm Hämoglobin ergaben sich Werte für den mittleren Aktivitätskoeffizienten von KCl in den Hämoglobin-KCl-Lösungen, die linear mit der Hämoglobinkonzentration abnahmen. Diese Abnahme war jedoch nur gering: Selbst bei einer Hämoglobinkonzentration von 45 Gew.-% lag der mittlere Aktivitätskoeffizient von KCl nur um 23% niedriger als in einer reinen 0.1 molalen KCl-Lösung. Der größte Teil der Ionen sollte also, wie auch von anderen Autoren für andere, konzentrierte Protein-Salzlösungen gezeigt wurde [43,47,45], in freier Form vorliegen.

Es konnte gezeigt werden, daß sich die gemessenen Aktivitätskoeffizienten durch verschiedene Wechselwirkungsmechanismen zwischen den Komponenten der Hämoglobin-KCl-Lösung deuten lassen, wobei eine spezifische Bindung von Cl^- -Ionen am Hämoglobinmolekül am wahrscheinlichsten erscheint. Diesem Bindungseffekt sind jedoch der Effekt des am Proteinmolekül "gebundenen Wassers" und eventuell die Einwirkung des elektrostatischen Feldes des Hämoglobinpolyions auf die K^+ - und Cl^- -Ionen überlagert.

Bisher liegen keine experimentellen Ergebnisse vor, die zwingend zu dem Schluß führen, daß das Zellwasser in der lebenden Zelle eine besondere Struktur annimmt:

Entgegen der Annahme der Sorptionstheorie [56] , oder der "association-induction"-Hypothese [28,31] zeigen zahlreiche Untersuchungen [38-42,7,27,5,34,23] , daß das Zytoplasma der lebenden Zelle in seinen elektrischen und thermodynamischen Eigenschaften nicht erheblich von konzentrierten Makromolekül-Salz-Lösungen abweicht (s. [37]).

Die Ergebnisse dieser Arbeit, gewonnen aus Untersuchungen an konzentrierten Hämoglobin-KCl-Lösungen, lassen sich daher auf das Zytoplasma des Erythrozyten übertragen: Der größte Teil der kleinen Ionen sollte auch dort in freier Form vorliegen. Die verschiedentlich postulierte Bindung des größten Teils der Ionen im Zytoplasma läßt sich anhand der vorliegenden Untersuchung nicht bestätigen.

6. Literatur-Verzeichnis

1. G.S. Adair, M.E. Adair: Proc. Roy. Soc. (London) A90
(1947), 341
2. H. Aebi: Einführung in die praktische
Biochemie,
Karger, Germering (München),
1965, S.220
3. C.H. Amberg: J. Amer. Chem. Soc. 79 (1957),
3980
4. P. Andrews: Biochem. J. 91 (1964), 222
5. E.L. Andronikashvili, in L.P. Kayushin (Ed.) "Water in
G.M. Mrevlishvili, Biological Systems", übersetzt
P.L. Privalov: aus dem Russ., Consultants,
New York, 1969, p.63
6. H.B. Bull, K.Breese: Arch. Biochem. Biophys. 128
(1968), 488
7. W.H. Bunch, G.Kallsen: Science 164 (1969), 1178
8. C.W. Carr; Ann.N.Y.Acad.Sci. 148 (1968),
180
9. C.W. Carr: Arch. Biochem. Biophys. 46
(1953), 417
10. C.W. Carr: Arch. Biochem.Biophys. 62 (1956),
476
11. B.E. Conway: "Electrochemical Data", Elsevier
Publ.Comp., Amsterdam, Houston,
London, New York, 1952

26. E.M. Jope in
F.C.W. Roughton,
C.E. Kendrew, (Ed.):
"Haemoglobin", Butterworth,
London 1949, p. 205
27. M.J. Kushmerick,
R.J. Podolsky:
Science 166 (1969), 1297
28. G.N. Ling:
"A Physical Theory of the Living
State; The Association-Induction
Hypothesis",
Blaisdell, New York, 1962.
29. G.N. Ling:
Ann. N.Y. Acad. Sci. 125 (1965),
401
30. G.N. Ling, F.W. Cope:
Science 163 (1969), 1335
31. G.N. Ling:
Internatl. Rev. Cytology 26
(1969), 1
32. D. Martinez,
A.A. Silvidi,
R.M. Stokes:
Biophys. J. 2 (1969), 1256
33. R. Morris, R.D. Wright:
Australian J. Exptl. Biol. Med.
Sci. 32 (1954), 669
34. G.M. Mrevslishvili,
P.L. Privalov:
in L.P. Kayushin (Ed.)
"Water in Biological Systems",
übersetzt aus dem Russ.,
Consultants Bureau, New York,
1969, p. 63
35. J.L. Oncley:
in E.J. Cohn, J.T. Edsall:
"Proteins, Amino Acids and Peptides
as Ions and Dipolar Ions",
Reinhold Publ. Comp., New York,
1943, p. 543
36. J. Th. G. Overbeek:
J. Colloid Sci. 8 (1953), 593
und Progr. Biophys. Chem. 6
(1956), 57

37. H. Pauly: "Thermodynamische und elektrische Eigenschaften des Zytoplasmas" in W. Beier (Ed.): "Fortschritte der experimentellen und theoretischen Biophysik", Thieme, Leipzig, im Druck.
38. H. Pauly: Nature, 183 (1959), 333
39. H. Pauly, H.P.Schwan: ONR Techn. Report 28, 1959, Univ. of Pennsylvania, Electromed. Lab., The Moore School of Electrical Engineering
40. H. Pauly: Biophysik 1 (1963), 143
41. H. Pauly, H.P.Schwan: Biophys. J. 6 (1966), 621
42. H. Pauly; "Physikalische Grundlagen der Medizin; Abhdlgn. aus der Biophysik" in W. Beier (Ed.): Heft 7, Edition Leipzig, 1967, p. 85
43. H. Pfister: Dissertation, Erlangen 1971
44. H. Pfister: Diplomarbeit, Frankfurt a.M., 1963
45. H. Pfister: Z. Naturf. 25 b (1970), 1130
46. H. Pfister, H.Pauly: Biophysik 6 (1969), 94; Pflügers Arch. 319 (1970), R 163 (38. Tagung der Dt. Physiolog. Ges., 1970, Erlangen)
47. H. Pfister, H.Pauly: J. Polym. Sci. C, NO. 39. (1972), pp. 179-189
48. R.A. Robinson, "Electrolyte Solutions", R.H. Stokes: Butterworth, Scientific Publ., London 1959, S. 24 ff.

49. D. Rosen: Trans. Farad. Soc. 59 (1963),
1211
50. G. Scatchard: J. Amer. Chem. Soc. 75 (1953), 2883
51. G. Scatchard: in Shedlovsky (Ed.): "Elektro-
chemistry in Biology and Medicine",
J. Wiley & Sons, New York, 1955,
p. 18
52. K. Sollner: Ann. N.Y. Acad. Sci. 148 (1968),
154
53. J. Steinhardt,
J.A. Reynolds: "Multiple Equilibria in Proteins",
Acad. Press, New York u. London,
1969 p. 21⁴ ff., 316ff.
54. A.S. Tombalakian,
W.F. Graydon: J. Phys. Chem. 70 (1966), 3711
55. A.S. Tombalakian: J. Phys. Chem. 72 (1968), 1566
56. A.S. Troschin: "Problems of Cell Permeability",
Pergamon Press, Oxford, 1966

Herrn Professor Dr. Dr. H. Pauly danke ich für die Überlassung des Themas, die beachtliche materielle Unterstützung zur Durchführung der Dissertation und für die ausgezeichneten Arbeitsmöglichkeiten am Institut für Physikalische und Medizinische Strahlenkunde Erlangen - Nürnberg.

Herrn Doktor H. Pfister spreche ich nicht nur an dieser Stelle meinen besonders herzlichen Dank aus. Herr Dr. Pfister hat durch sein Sachverständnis, seine wohlwollende Hilfsbereitschaft und nicht zuletzt durch seinen persönlichen Einsatz das Gelingen dieser Arbeit weithin gefördert.

Allen Angehörigen des Institutes danke ich für ihr freundliches Entgegenkommen in vielen Fragen, für Diskussionen, Ermunterung und gutes Arbeitsklima.

Lebenslauf

Am 2. Juli 1946 wurde ich, Godehard Menges, als zweiter Sohn des Prokuristen Hugo Menges und seiner Ehefrau Elisabeth, geborene Fröhlich, in Opladen, NR-Westfalen, geboren.

Nach Besuch der Volksschule in Opladen sowie neusprachlich-naturwissenschaftlicher Gymnasien in Opladen, Hannover und Karlsruhe bestand ich im Herbst 1966 das Abitur.

Im Wintersemester 1966/67 begann ich das Medizinstudium an der Universität Erlangen-Nürnberg. Ab Sommersemester 1971 setzte ich das medizinische Studium an der Universität Hamburg fort und schloß es dort im Sommer 1973 mit dem Staatsexamen ab.

Offsetdruck-Fotodruck

J. Hög, 8520 Erlangen, Hauptstr. 109 (Nähe Martin-Luther-Platz) Tel. 22990